

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/018494 A1

(51) 国際特許分類: C07H 19/067, 19/073, 19/167, 19/173, A61K 31/7068, 31/7072, 31/7076, 31/708, A61P 43/00

[JP/JP]; 〒001-0027 北海道 札幌市北区 北 2 7 条西 6 丁目 2 番 1 2 号 Hokkaido (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010576

(71) 出願人 および

(22) 国際出願日: 2003年8月21日 (21.08.2003)

(72) 発明者: 松田 彰 (MATSUDA, Akira) [JP/JP]; 〒060-0812 北海道 札幌市北区 北 1 2 条西 6 丁目 北海道大学大学院薬学研究科薬化学分野内 Hokkaido (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(72) 発明者; および

(26) 国際公開の言語: 日本語

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 加藤 優佳 (KATO, Yuka) [JP/JP]; 〒060-0812 北海道 札幌市北区 北 1 2 条西 6 丁目 北海道大学大学院薬学研究科薬化学分野内 Hokkaido (JP). 南川 典昭 (MINAKAWA, Noriaki) [JP/JP]; 〒060-0812 北海道 札幌市北区 北 1 2 条西 6 丁目 北海道大学大学院薬学研究科薬化学分野内 Hokkaido (JP).

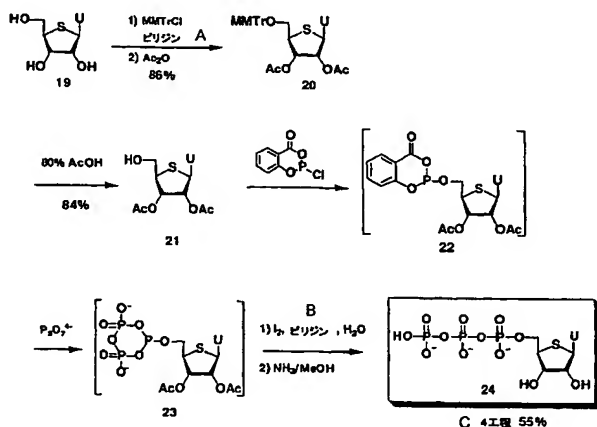
(30) 優先権データ:
特願2002-242259 2002年8月22日 (22.08.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ジェネティックラボ (GENETICLAB CO., LTD.)

[続葉有]

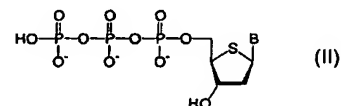
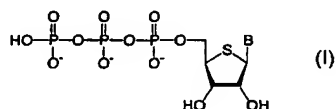
(54) Title: 4'-THIONUCLEOTIDE

(54) 発明の名称: 4' -チオヌクレオチド



A...PYRIDINE
B...I₂, PYRIDINE, H₂O
C...4 STEPS, 55%

(57) Abstract: A compound represented by the formula (I): (I) (wherein B is a nucleic acid base selected from the group consisting of adenine, guanine, cytosine, uracil, and hypoxanthine); a compound represented by the formula (II): (II) (wherein B' is a nucleic acid base selected from the group consisting of adenine, guanine, cytosine, thymine, uracil, and hypoxanthine); a method of synthesizing these nucleoside triphosphates; and a process for producing an oligonucleotide from these nucleoside triphosphates.



[続葉有]



(74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO,Seiji et al.); 〒100-6036
東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 霞が関ビル
36階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

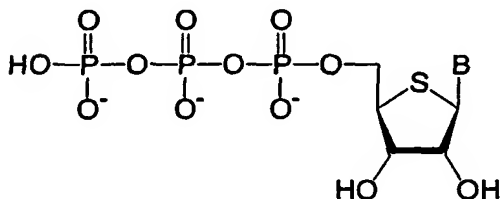
添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

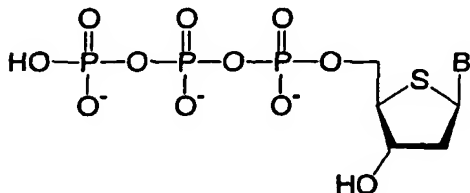
(57) 要約:

式 I :



[式中, Bはアデニン, グアニン, シトシン, ウラシルおよびヒポキサンチンか
らなる群より選択される核酸塩基である]

の化合物, および式 I I :



[式中, B' はアデニン, グアニン, シトシン, チミン, ウラシルおよびヒポキ
サンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

の化合物, これらのヌクレオシド三リン酸を合成する方法, ならびにこれらのヌ
クレオシド三リン酸を用いてオリゴヌクレオチドを製造する方法が提供される。

明細書

4'-チオヌクレオチド

技術分野

- 5 本発明は、ヌクレオチド類似体およびその製造方法に関する。より詳細には、本発明は、4'-チオリボヌクレオチドおよび4'-チオ-2'-デオキシヌクレオチド、これらのヌクレオチド類似体の製造方法、ならびにこれらのヌクレオチド類似体を用いてオリゴヌクレオチドを製造する方法に関する。

10 背景技術

4'-チオヌクレオシドはフラノース環の酸素原子が硫黄原子に置換されたヌクレオシドの総称である。



- 4'-チオリボヌクレオシドまたは4'-チオ-2'-デオキシリボヌクレオシドを含むRNAまたはDNAは、種々のヌクレアーゼに対して抵抗性を示すため、研究試薬および診断または治療用の薬剤として有用であることが示唆されている。

- Bellon ら (Biochem. Biophys. Res. Comm., 1992, 184, 797-803) は、1-(4'-チオ-β-D-リボフラノシル) チミンを含むオリゴデオキシヌクレオチドの合成を記載する。Bellon ら (Nucleic Acids Res., 1993, 21, 1587-1593) , Leydier ら (Antisense Res. Dev. 1995, 5, 167-174) および Leydier ら (Nucleosides Nucleotides, 1995, 14, 1027-1030) は、4'-チオ-β-D-オリゴリボヌクレオチドが高いヌクレアーゼ耐性を有することを記載する。Dukhan ら (Nucleosides Nucleotides, 1999, 18, 1423-1424) は、4種の4'-チオリボヌクレオシドを含むオリゴヌクレオチドの合成を記載する。

Bellon ら (Nucleic Acids Res., 1993, 21, 1587-1593) は、4'-チオウリジンのみからなるRNAの分解酵素に対する抵抗性を調べ、天然型U₆と比較して、

4' -^SU₆が種々の分解酵素に対して遙かに強い抵抗性を示すことを報告している。

一方、デオキシリボヌクレオシドに関しても、いくつかの合成例が報告されている。Hancox ら (Nucleic Acids Res., 1993, 21, 3485-3491) は、4' -チオー
5 2' -デオキシチミジンおよびこれを含むオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成を記載する。Boggon ら (Nucleic Acids Res., 1996, 24, 951-961) は、4' -チオー
2' -デオキシチミジンを含む合成DNAオリゴマーの構造を記載する。Jones ら (Nucleic Acids Res., 1996, 24, 4117-4122) および Jones ら (Bioorg.
Med. Chem. Lett., 1997, 7, 1275-1278) は、4' -チオー2' -デオキシヌクレ
10 オチドを含む合成DNAオリゴマーを記載する。Kumar ら (Nucleic Acids Res., 1997, 25, 2773-2783) は、4' -チオー2' -デオキシシチジンを含む合成DNAオリゴマーを記載する。

しかし、これらのいずれのオリゴリボヌクレオチド、オリゴデオキシリボヌクレオチドも化学合成により製造されている。この方法では、長鎖のオリゴヌクレ
15 オチドを得ることは困難であり、かつコストが高い。

4' -チオヌクレオシドからRNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ、リバーストランスクリプターゼ等の酵素を用いてオリゴヌクレオチドを合成するためには、4' -チオヌクレオシドを三リン酸化することが必要である。

Alexandrova ら (Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 1995, 7, 237-242) は、
20 4' -チオー5 -エチル-2' -デオキシウリジン 5' -三リン酸の合成およびこれがDNA合成酵素により認識されることを記載する。しかし、この特定の塩基以外の4' -チオデオキシリボヌクレオシド三リン酸または4' -チオリボヌクレオシド三リン酸はこれまでに得られていない。これは、立体選択的合成の困難性のためであると考えられる。

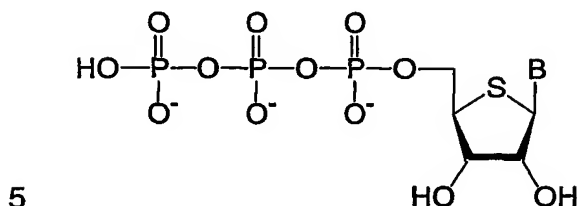
25 したがって、当該技術分野においては、RNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ等の酵素により認識され伸長されることができる4' -チオヌクレオチドを合成するための新規かつ改良された方法が求められている。

したがって、本発明は、新規ヌクレオシド三リン酸、およびこれを合成する方法、ならびにこれらのヌクレオシド三リン酸を用いてオリゴヌクレオチドを製造

する方法を提供することを目的とする。

発明の開示

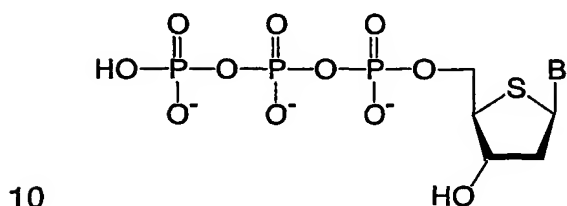
本発明は、式 I :



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

で表される4'-チオリボヌクレオチドを提供する。

本発明はまた、式 I I :

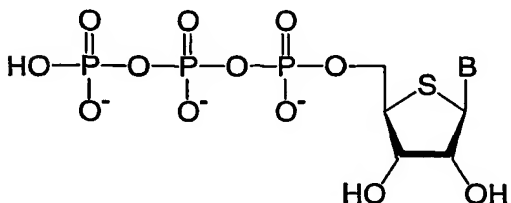


[式中、B'はアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

で表される4'-チオール-2'-デオキシヌクレオチドを提供する。

15 本発明の4'-チオヌクレオチド類は、RNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ等の酵素により認識され伸長されることができ、ヌクレアーゼに対して抵抗性を有するRNAまたはDNAを合成するためのモノマー単位として有用である。

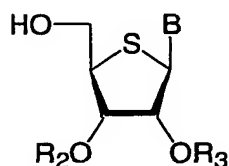
別の観点においては、本発明は、式 I :



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンか

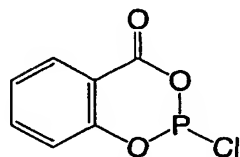
らなる群より選択される核酸塩基である]

で表される 4' -チオリボヌクレオチドを合成する方法を提供する。該方法は、式 I I I :



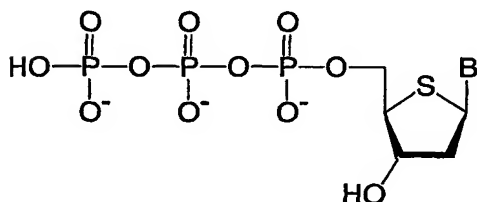
- 5 [式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基であり、R₂およびR₃はそれぞれ独立してヒドロキシル基の保護基である]

の化合物を、式 I V :



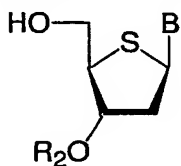
- 10 の化合物と反応させ、得られた中間体をピロリン酸と反応させ、次にヨード酸化、加水分解および脱保護することを含む。

さらに別の観点においては、本発明は、式 I I :



- 15 [式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

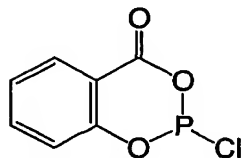
で表される 4' -チオー 2' -デオキシヌクレオチドを合成する方法を提供する。該方法は、式 V :



- 20 [式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基であり、R₂はヒドロキシル基の保護

基である]

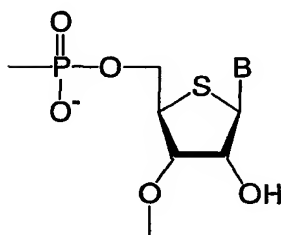
の化合物を、式 I V :



の化合物と反応させ、得られた中間体をピロリン酸と反応させ、次にヨード酸化、

- 5 加水分解および脱保護することを含む。

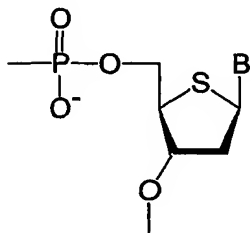
本発明のさらに別の観点においては、本発明は、式 V I :



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

- 10 のヌクレオチド単位を少なくとも1つ含むオリゴヌクレオチドを製造する方法を提供する。該方法は、本発明の4'-チオリボヌクレオチドの存在下で、RNA合成酵素によりRNA鎖伸長反応を行うことを特徴とする。RNA合成酵素としては、RNAポリメラーゼが挙げられる。

本発明のさらに別の観点においては、本発明は、式 V I I :



15

[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

のヌクレオチド単位を少なくとも1つ含むオリゴヌクレオチドを製造する方法であって、本発明の4'-チオ-2'-デオキシヌクレオチドの存在下で、DNA

合成酵素によりDNA鎖伸長反応を行うことを特徴とする。DNA合成酵素としては、DNAポリメラーゼ、リバーストランスクリプターゼ、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼが挙げられる。

- 本発明の方法により製造される、4'-チオリボヌクレオシドまたは4'-チ
5 オー2'-デオキシリボヌクレオシドを含むRNAまたはDNAは、種々のヌク
レアーゼに対して抵抗性を示すため、研究試薬および診断または治療用の薬剤と
して有用である。本発明にしたがえば、酵素を用いてオリゴヌクレオチドを合成
することができるため、従来の化学合成方法と比較して、より長い鎖のオリゴヌ
クレオチドを簡便に製造することができる。また、本発明の方法により製造され
10 る、4'-チオリボヌクレオシドを含むRNAは、逆転写酵素により認識される
ため、これをテンプレートとしてcDNAを合成することができ、したがって、
インビトロセクションにおいて用いるのにきわめて有用である。

図面の簡単な説明

- 15 図1は、実施例9に記載される4'-チオUTPの合成スキームを示す。
図2は、実施例10に記載される4'-チオCTPの合成スキームを示す。
図3は、実施例11に記載される4'-チオATPの合成スキームを示す。
図4は、実施例12に記載される4'-チオGTPの合成スキームを示す。
図5は、実施例13に記載される4'-チオー2'-デオキシUTPの合成ス
20 キームを示す。
図6は、実施例14に記載される4'-チオー2'-デオキシCTP、4'-
チオー2'-デオキシATPおよび4'-チオー2'-デオキシGTPの合成ス
キームを示す。
図7は、T7RNAポリメラーゼを用いる4'-チオUTPの取り込み実験の
25 概要を示す。
図8は、T7RNAポリメラーゼを用いる4'-チオUTPの取り込み実験の
結果を示す。
図9は、T7RNAポリメラーゼを用いる4'-チオUTPおよび4'-チオ
CTPの取り込み実験の概要を示す。

図10は、T7 RNAポリメラーゼを用いる4'-チオUTPおよび4'-チオCTPの取り込み実験の結果を示す。

図11は、4'-チオUTPおよび4'-チオCTPを含有するRNAからの逆転写酵素によるcDNA合成実験の概要を示す。

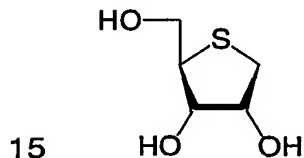
- 5 図12は、4'-チオUTPおよび4'-チオCTPを含有するRNAからの逆転写酵素によるcDNA合成実験の結果を示す。

図13は、4'-チオUTPおよび4'-チオCTPを含有するRNAのRNase耐性を示す。

10 発明の詳細な説明

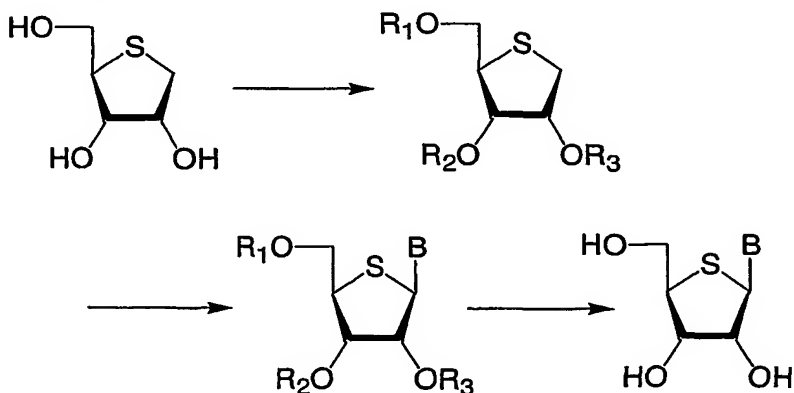
本発明のヌクレオシド三リン酸は、公知の4-チオ糖から出発して、糖に塩基を立体選択的に導入し、次に5'位に選択的にリン酸基を導入することにより製造することができる。

4'-チオウリジンは、4-チオ糖



の2, 3および5位のヒドロキシル基を適切に保護し、プンメラー

(Pummerer) 反応を用いて塩基を立体選択的に導入することにより得ることができる。



- 20 [式中、 R_1 、 R_2 および R_3 は、独立してヒドロキシル保護基であり、 R_1 と R_2 、および R_2 と R_3 は一緒になって二官能性のヒドロキシル保護基であってもよ

い]。

R₃は、電子供与性の置換基をもつアシル保護基であるほど立体選択性が向上し、好ましくは2, 4-ジメトキシベンゾイル基である。

5 プンメラー反応によって得られた18のウリジン誘導体は、フッ化アンモニウム、メチルアミンを用いて脱保護をおこない、19の4'-チオウリジンへと変換することができる。次に、19の4'-チオウリジンより4'-チオUTPを合成する(図1)。

10 19の化合物の5'位をモノメトキシトリチル化および2', 3'位をアセチル化して化合物20を得る。続いて脱モノメトキシトリチル化を行い、21のアセチル体を得る。得られた化合物21より、Ecksteinらの方法(Luding, J. and Eckstein, F. (1989) J. Org. Chem., 54, 631-635)を応用して、24の4'-チオUTPを合成する。すなわち、サリチルホスホクロリダイトを用いて22の中間体へと導き、ピロリン酸で処理して23のシクロトリホスファイト体へ誘導する。次にヨード酸化、加水分解および脱アセチル化を経て、目的物の4'-チオ
15 UTPを得ることができる。

28の4'-チオCTPは、25のN⁴-ベンゾイル-4'-チオシチジンから、上述の4'-チオUTPと同様の工程により製造することができる(図2)。

4'-チオITPは、4'-チオヒポキサンチンから、上述の4'-チオUTPと同様の工程により製造することができる。

20 4'-チオATPおよび4'-チオGTPは、図3および図4に記載されるスキームにより製造することができる。すなわち、2', 3'位のヒドロキシル基およびプリン環のアミノ基を適切に保護した後、4'-チオCTPの製造と同様に、Ecksteinらの方法(上述)にしたがってサリチルホスホクロリダイトと反応させ、次にピロリン酸と反応させてシクロトリホスファイト中間体を得る。
25 続いてヨード酸化、加水分解および脱保護を行うことにより、32の4'-チオATPおよび37の4'-チオGTPを得ることができる。

4'-チオ-2'-デオキシリボヌクレオシド三リン酸は、4'-チオリボヌクレオシド三リン酸と同様に製造することができる。出発物質としては4'-チオ-2'-デオキシリボヌクレオシドを用い、次に、サリチルホスホクロリダ

イトと反応させ、得られた中間体をピロリン酸と反応させ、次にヨード酸化、加水分解および脱保護することにより、目的とする4'-チオ-2'-デオキシリボヌクレオシド三リン酸を得ることができる(図5, 6)。

本発明の4'-チオヌクレオチド類は、ポリメラーゼを用いるDNAまたはRNAの合成反応の基質として用いることができる。本発明の4'-チオリボヌクレオチドがRNAポリメラーゼにより認識されることを確認するためには、適切なテンプレートの存在下でRNAポリメラーゼを作用させて、4'-チオリボヌクレオチドがオリゴマー中に取り込まれるか否かを調べる。実施例15および16に示されるように、本発明にしたがって合成した4'-チオヌクレオチドはT7 RNAポリメラーゼにより認識され、天然のヌクレオチドと同様に合成オリゴマー鎖中に取り込まれることが見いだされた。

すなわち、本発明の別の観点においては、本発明は、4'-チオヌクレオチド類を用いるオリゴヌクレオチドの製造方法を提供する。オリゴヌクレオチドは、本発明の4'-チオヌクレオシド三リン酸の存在下で、RNAまたはDNA合成酵素RNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼ等の酵素によりオリゴヌクレオチド鎖を伸長させることにより製造することができる。RNA合成酵素としては、種々の生物に由来する各種のRNAポリメラーゼを用いることができ、DNA合成酵素としては種々の生物に由来するDNAポリメラーゼ、リバーストランスクリプターゼ、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ等を用いることができる。伸長反応の条件は、用いるポリメラーゼにより様々であるが、当業者は適切な反応条件を選択することができる。反応においては、本発明の4'-チオヌクレオシド三リン酸に加えて、天然のヌクレオシド三リン酸または当該技術分野において知られる修飾ヌクレオシド三リン酸が存在していてもよい。

本発明の方法により得られるオリゴヌクレオチドは、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、プライマー、アプタマー、アンチジーン、RNAi, siRNA, プローブ等として、診断、治療および研究試薬として使用することができる。好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは約6から約50ヌクレオチドの長さである。本発明のより好適な実施態様においては、オリゴヌクレオチドは約12から約20ヌクレオチドの長さである。オリゴヌクレオチドは、修飾さ

- れた糖，例えば2' 位に置換基を有する糖を含んでいてもよく，アデニン，グアニン，シトシン，チミン，ウラシル以外の核酸，例えばヒポキサンチン，5-アルキルシチジン，5-アルキルウリジン，5-ハロウリジン，6-アザピリミジン，6-アルキルピリミジン等を含んでいてもよい。また，ホスホジエステル以外のヌクレオシド間結合，例えばホスホロチオエート結合を含んでいてもよい。

本発明のオリゴヌクレオチドは，ヌクレアーゼ耐性および熱安定性が高いため，インビトロおよびインビボにおいて使用するのに適しており，特に遺伝子治療において有用である。また，本発明の4'-チオオリゴヌクレオチドを含むRNAは逆転写酵素により認識されてcDNAが合成されるため，インビトロセクションにおいて用いるのにきわめて有用である。

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。また，本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願2002-242259号の明細書および図面に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

実施例

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが，これらの実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

実施例においては，次の略号を用いる

- 20 Bz ベンゾイル
DMap 4-ジメチルアミノピリジン
DMBz ジメトキシベンゾイル
DMTr 4,4'-ジメトキシトリチル
MMTr 4-メトキシトリチル
25 Ms メタンスルホニル
Tf トリフルオロエタンスルホニル
TFA トリフルオロ酢酸
THF テトラヒドロフラン
TIPDS 1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル

TMS トリメチルシリル

Ts p-トルエンスルホニル

実施例 1 2,3,5-トリ-O-p-メトキシベンジル-D-リビトール(3)の合成

- 5 D-リボース(60 g, 0.4 mol)をアリルアルコール (1.8 L, 26.4 mol)に溶解し、濃硫酸(6.4 mL, 0.12 mol)を 0 °Cにて加え、その後室温にてオーバーヘッドで撹拌した。次いで反応液に重曹を加えて中和し、反応液をセライト濾過した。得られたろ液を減圧下にて溶媒留去し減圧乾燥して、黄色油状の残渣を得た。続いて水素化ナトリウム (64 g, 1.6 mol)の THF (700 mL)溶液に、0°C下にて DMF (300
- 10 mL)に溶解した残渣を 3 時間かけてカニュレーションした。反応液を再び室温に戻し 4 時間撹拌した後、再度 0°C下にて塩化パラメトキシベンジル (190 mL, 1.4 mol)を 10 mL / 15 min の速度で滴下した。100 mL 滴下したところで室温に戻し H₂の発生状況をみながら、慎重に滴下をつづけた。滴下終了後、室温にて撹拌し、13 時間後水素化ナトリウム (4.0 g, 0.1 mol)と塩化パラメトキシベンジル
- 15 (30 mL, 0.22 mol)を加えて 24 時間撹拌し、反応液を飽和塩化アンモニウム水溶液にて中和した。つづいて酢酸エチルで希釈し、水で分液した。有機層を水(×3)、飽和食塩水(×1)で洗浄し、Na₂SO₄乾燥した。ついで綿栓ろ過後に溶媒を留去し、得られた褐色の残渣を減圧乾燥後、クロロホルム(1.2 L)に溶解し、酸素を封入した。そこに水(800 mL)を加え塩化パラジウム(21.2 g, 0.12 mol)を加え、
- 20 50°Cにてオーバーヘッドで撹拌した。9 時間後に塩化パラジウム(7.0 g, 0.04 mol)を加え、28 時間後に反応液を室温に戻してセライトろ過し、濃縮した後酢酸エチルで希釈し、水で分液した。有機層を水(×2)、飽和食塩水(×1)で洗浄し、Na₂SO₄乾燥した。ついで綿栓ろ過後に溶媒を留去し得られた褐色の残渣を減圧乾燥した。残渣を乾燥後、メタノール(1.2 L)に溶解し、アルゴン雰囲気下、0°C
- 25 にて水素化ホウ素ナトリウム(30.3 g, 0.8 mol)を加え 20 分撹拌後、室温に戻して撹拌した。1 時間後、再び 0°Cにて水素化ホウ素ナトリウム(7.8 g, 0.2 mol)を加え、次いで室温に戻して撹拌した。1.5 時間後、反応液の溶媒を留去し、残渣をメタノールにて 2 回共沸し、残渣を酢酸エチルに溶解し水で分液した。有機層を水(×2)、飽和食塩水(×1)で洗浄し、Na₂SO₄乾燥した。ついで綿栓ろ過後に溶

媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 5 : 1 → 1 : 1)により精製し、化合物 3(162.4 g, 79%)を無色透明の油状物質として得た。
 ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ : 7.30-6.81 (m, 12H, Ar), 4.66-4.40 (m, 6H, CH_2), 3.94-3.53 (m, 16H, H-1, 2, 3, 4, 5, $\text{MeO} \times 3$), 2.71 (br s, 1H, 4-OH), 2.36 (br s, 1H, 1-OH).

実施例2 1,4-アンヒドロ-2,3,5-トリ-O-p-メトキシベンジル-4-チオ-D-リビトール(5)の合成

アルゴン雰囲気下、化合物 3(162 g, 0.32 mol)のピリジン溶液(900 mL)に 0°C にて塩化メシル(122 mL, 1.6 mol)を加え、同温度で 30 分撹拌した。次いで反応溶液に氷を加え 20 分撹拌した。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液($\times 2$)、飽和食塩水($\times 1$)にて洗浄し、 Na_2SO_4 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去し、トルエンで 3 回共沸した。残渣を減圧乾燥した後、アルゴン雰囲気下 MEK (1 L) に溶解し、室温にて臭化リチウム(278 g, 3.2 mol)を加えて加熱還流した。12 時間後反応液を室温に戻し、酢酸エチルで希釈し、水で分液した。有機層を水($\times 2$)、飽和食塩水($\times 1$)にて洗浄し、 Na_2SO_4 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去し、得られた残渣を減圧乾燥した後、アルゴン雰囲気下 DMF(1 L)に溶解し、室温にて硫化ナトリウム・九水和物(92.2 g, 0.38 mol)を加え 100°C にて 30 分撹拌した。次いで反応溶液を室温に戻し、酢酸エチルで希釈し、水で分液した。有機層を水($\times 2$)、飽和食塩水($\times 1$)にて洗浄し、 Na_2SO_4 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 10 : 1 → 1 : 1)で粗精製した後、ヘキサン、酢酸エチルより再結晶した。化合物 5 (69.1 g, 42%) を白色の結晶として得た。
 ^1H NMR (270 MHz, CDCl_3) δ : 7.26-6.81 (m, 12H, Ar), 4.52-4.38 (m, 6H, CH_2), 4.01-3.95 (m, 1H, H-2), 3.91 (t, 1H, H-3, $J_{3,2}=4.0$, $J_{3,4}=4.0$ Hz), 3.80 (s, 9H, $\text{MeO} \times 3$), 3.66-3.60 (m, 1H, H-4), 3.45-3.40 (m, 2H, H-5a, H-5b), 3.02 (dd, 1H, H-1a, $J_{1a,1b}=10.6$, $J_{1a,2}=6.5$ Hz), 2.87 (dd, 1H, H-1b, $J_{1b,1a}=10.6$, $J_{1b,2}=5.2$ Hz).

実施例3 1,4-アンヒドロ-2-O-(4-メトキシベンゾイル)-3,5-O-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-4-チオ-D-リビトール(13b)の合成

アルゴン雰囲気下化合物 12(997 mg, 2.5 mmol)のピリジン溶液(15 mL)に 0℃にて、塩化 4-メトキシベンゾイル(723 μ L, 5.1 mmol)を加え、室温にて 18.5 時間攪拌した。反応液に氷を加え 10 分間攪拌した。次いで、酢酸エチルで希釈し、水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液($\times 3$), 飽和食塩水($\times 1$)で洗淨し, Na_2SO_4 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去し, トルエンで 3 回共沸した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 50 : 1 \rightarrow 35 : 1)で精製し, 化合物 13b(1.3 g, 96%)を無色油状物質として得た。

10 FAB-LRMS m/z 527 (MH^+).

FAB-HLRS 計算値 $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{SSi}_2$ (MH^+) 527.2319. 実測値 527.2311.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.95-6.61 (m, 4H, Ar), 5.71-5.69 (m, 1H, H-2), 4.35 (dd, 1H, H-3 $J_{3,2}=3.5$, $J_{3,4}=9.4$ Hz), 4.12 (dd, 1H, H-5a, $J_{5a,4}=2.9$, $J_{5a,5b}=12.6$ Hz), 3.98 (dd, 1H, H-5b, $J_{5b,4}=3.2$, $J_{5b,5a}=12.6$ Hz), 3.69 (m, 1H, H-4), 15 3.24 (dd, 1H, H-1 β , $J_{1\beta,2}=3.2$, $J_{1\beta,1\alpha}=12.6$ Hz), 3.04 (m, 6H, Me_2N), 2.91 (d, 1H, H-1 α , $J_{1\alpha,1\beta}=12.6$ Hz), 1.13-0.87 (m, 28H, TIPDS).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 166.40, 153.59, 131.73, 117.34, 110.94, 110.81, 75.95, 75.21, 60.16, 51.29, 40.44, 31.60, 17.84, 17.77, 17.70, 17.66, 17.52, 17.45, 13.87, 13.75, 13.15, 13.09.

20

実施例4 1,4-アンヒドロ-2-O-(4-ジメチルアミノベンゾイル)-3,5-O-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-4-チオ-D-リビトール(13c)の合成

アルゴン雰囲気下 4-ジメチルアミノ安息香酸(1.1 g, 6.4 mmol)の塩化メチレン溶液(40 mL)に、塩化チオニル(933 μ L, 12.8 mmol)を加えて 2 時間加熱還流しながら攪拌し、室温に戻して減圧下溶媒を留去した。得られた残渣(533 mg)をアルゴン雰囲気下化合物 12(375 mg, 0.96 mmol)のピリジン溶液(5 mL)に 0℃にて加え、室温にて 8 時間攪拌した。8 時間後再び先の残渣を(355 mg)を加え、21 時間後ピリジン(5 mL)を加えて 50℃にて 6 時間加熱した。反応液に氷を加え 10 分間攪拌した。次いで、酢酸エチルで希釈し、水で分液した。有機層を飽和炭酸

25

水素ナトリウム水溶液(×3),飽和食塩水(×1)で洗浄し Na_2SO_4 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去し, トルエンで3回共沸した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン: AcOEt = 50 : 1 → 20 : 1)で精製し, 化合物 13c(476 mg, 92%)を無色油状物質として得た。

5 FAB-LRMS m/z 540(MH^+).

FAB-HLRS 計算値 $\text{C}_{26}\text{H}_{45}\text{NO}_5\text{Si}_2$ (MH^+) 540.2635. 実測値 540.2637.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.95-6.61 (m, 4H, Ar), 5.71-5.69 (m, 1H, H-2), 4.35 (dd, 1H, H-3 $J_{3,2}=3.5$, $J_{3,4}=9.4$ Hz), 4.12 (dd, 1H, H-5a, $J_{5a,4}=2.9$, $J_{5a,5b}=12.6$ Hz), 3.98 (dd, 1H, H-5b, $J_{5b,4}=3.5$, $J_{5b,5a}=12.6$ Hz), 3.69 (m, 1H, H-4), 3.24 (dd, 1H, H-1 β , $J_{1\beta,2}=3.2$, $J_{1\beta,1\alpha}=12.6$ Hz), 3.04 (m, 6H, Me_2N) 2.91 (d, 1H, H-1 α , $J_{1\alpha,1\beta}=12.6$ Hz), 1.13-0.87 (m, 28H, TIPDS).

10 ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 166.40, 153.59, 131.73, 117.34, 110.94, 110.81, 75.95, 75.21, 60.16, 50.03, 40.44, 31.60, 17.84, 17.77, 17.71, 17.67, 17.52, 17.45, 13.87, 13.75, 13.15, 13.09.

15

実施例5 1,4-アンヒドロ-2-O-(4-メトキシベンゾイル)-3,5-O-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-4-チオ-D-リビトール-1-オキシド(14b)の合成

化合物 13b(1.1 g, 2.3 mmol)の塩化メチレン溶液(20 mL)に-78℃にてオゾンガスを20分間バブリングした。反応液にオゾン臭が消えるまでアルゴンをバブリングした後, 室温まで昇温した。減圧下溶媒を留去した後, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン: AcOEt = 4 : 1 → 1 : 3)で精製し, 化合物 14b(1.0 g, 82%)を無色あめ状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 543 (MH^+).

25 FAB-HLRS 計算値 $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_7\text{Si}_2$ (MH^+) 543.2253. 実測値 543.2251.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.06-6.90 (m, 4H, Ar), 5.84-5.82 (m, 1H, H-2), 4.61 (d, 1H, H-5a, $J_{5a,5b}=12.9$ Hz), 4.23 (dd, 1H, H-5b, $J_{5b,4}=2.9$, $J_{5b,5a}=12.9$ Hz), 4.17 (dd, 1H, H-3 $J_{3,2}=3.5$, $J_{3,4}=12.0$ Hz), 3.86 (s, 3H, MeO), 3.61 (dd, 1H, H-1 β , $J_{1\beta,2}=5.3$, $J_{1\beta,1\alpha}=15.5$ Hz), 3.48 (dd, 1H, H-4, $J_{4,5b}=2.1$, $J_{4,3}=12.0$ Hz), 2.93 (d,

^1H , H-1 α , $J_{1\alpha,1\beta} = 15.5$ Hz), 1.09-0.87 (m, 28H, TIPDS).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 165.42, 163.84, 132.20, 122.24, 113.96, 73.31, 73.15, 68.48, 55.79, 55.75, 54.59, 17.72, 17.64, 17.58, 17.54, 17.53, 17.49, 17.31, 17.30, 13.81, 13.51, 13.02, 13.00.

5

実施例 6 1-[2-O-(4-メトキシトリチル)-3,5-O-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-4-チオ- β -D-リボフラノシル]ウラシル(15b)

- アルゴン雰囲気下、ウラシル(408 mg)のトルエン懸濁液(20 mL)に室温にてトリエチルアミン(1.0 mL, 7.3 mmol), TMSOTf(2.6 mL, 14.6 mmol)を加え、反応液
- 10 が二層の溶液になるまで攪拌した。この反応溶液に塩化メチレン(10 mL)を加え、一層の溶液とし、室温にてこの反応溶液を化合物 14b(987 mg, 1.8 mmol)の塩化メチレン溶液(20 mL)に 15 分かけて滴下した。続いてトリエチルアミン(1.0 mL, 7.3 mmol)のトルエン溶液(10 mL)を室温にて 5 分かけて滴下した。反応溶液に氷
- 15 を加え、10 分間攪拌した後酢酸エチルで希釈し、水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液($\times 3$), 飽和食塩水($\times 1$)で洗浄し, Na_2SO_4 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン: AcOEt = 49: 1 \rightarrow 1: 1)で精製し, 化合物 15b(904 mg, 77%)を白色泡状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 637 (MH^+).

- 20 FAB-HLRS 計算値 $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_8\text{SSi}_2$ (MH^+) 637.2435. 実測値 637.2435.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 9.28 (br s, 1H, NH), 8.22 (dd, 1H, H-6, $J_{6,5} = 8.2$), 8.02-6.94 (m, 4H, Ar), 6.01 (s, 1H, H-1'), 5.76 (dd, 1H, H-5, $J_{5,6} = 8.2$, $J_{5,\text{NH}} = 2.1$ Hz), 5.62 (d, 1H, H-2', $J_{2',3'} = 3.5$), 4.45 (dd, 1H, H-3' $J_{3',2'} = 3.5$, $J_{3',4'} = 9.4$ Hz), 4.18-4.06 (m, 2H, H-5'a, H-5'b), 3.87 (s, 3H, MeO), 3.73-3.71 (m, 1H, H-4'), 1.15-

25 0.86 (m, 28H, TIPDS).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 164.01, 163.38, 163.10, 150.13, 140.653, 131.79, 121.73, 113.53, 102.19, 102.17, 78.06, 71.24, 62.54, 57.92, 55.40, 55.39, 50.69, 17.47, 17.36, 17.34, 17.27, 16.99, 16.96, 16.83, 16.79, 13.34, 13.18, 13.10, 13.48.

実施例 7 1-[5-O-(4-メトキシトリチル)-2,3-O-ジアセチル-4-チオ-β-D-リボフラノシル]ウラシル(20)

アルゴン雰囲気下、1-(4-チオ-β-D-リボフラノシル) ウラシル(131 mg, 0.5 mmol; 化合物 15 を NH₄F/MeOH, MeNH₂/MeOH で脱保護することにより製造)のピリジン(4 mL)溶液に塩化 4-メトキシトリチル(232 mg, 0.75 mmol)を加え、室温にて 14 時間攪拌した。アルゴン雰囲気下無水酢酸(188 μL, 2 mmol), DMAP(5 mg, 0.05 mmol)を加え室温にて 2 時間攪拌した。メタノールを加えて 30 分攪拌し、反応液を減圧下溶媒留去した。残渣を酢酸エチルに溶解し、水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(×3), 飽和食塩水(×1)で洗浄し、Na₂SO₄ 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 2: 1 → 1: 1)で精製し、化合物 20(214 mg, 70%)を無色透明の固体として得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ : 8.07 (br s, 1H, NH), 7.77 (d, 1H, H-6, J_{6,5} = 7.9), 7.47-6.85 (m, 14H, MMTr), 6.37 (d, 1H, H-1', J_{1',2'} = 7.3), 5.68 (dd, 1H, H-2', J_{2',1'} = 7.3, J_{2',3'} = 4.0), 5.54-5.51 (m, 1H, H-3'), 5.62 (dd, 1H, H-5, J_{5,6} = 7.9, J_{5,NH} = 2.6Hz), 3.81 (s, 3H, MeO), 3.62-3.53 (m, 2H, H-5'a, H-4'), 3.40-3.35 (m, 1H, H-5'b), 2.12-2.00 (m, 6H, AcO×2).

20 実施例 8 1-(2,3-O-ジアセチル-4-チオ-β-D-リボフラノシル)ウラシル(21)

化合物 20(199 mg, 0.32 mmol)を 80%酢酸水溶液に溶解し、室温にて 11 時間攪拌した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に滴下し、酢酸エチルで分液した。水層をクロロホルムで 7 回抽出し、有機層を飽和食塩水(×1)で洗浄し、Na₂SO₄ 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 2: 1 → AcOEt)で精製し、化合物 21(93 mg, 84%)を白色泡状物質として得た。

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ : 8.23 (br s, 1H, NH), 8.08 (d, 1H, H-6, J_{6,5} = 7.9), 6.36 (d, 1H, H-1', J_{1',2'} = 7.3), 5.85 (m, 1H, H-5), 5.69 (dd, 1H, H-2', J_{2',1'} = 7.3, J_{2',3'} = 4.0), 5.49 (m, 1H, H-3'), 4.16-4.04 (m, 1H, H-5'a), 3.86-3.82 (m, 1H, H-5'b),

3.56-3.55 (m, 1H, H-4'), 2.42 (br s, 1H, OH), 2.17 (s, 3H, AcO), 2.06 (s, 3H, AcO)

実施例 9 4'-チオウリジン 5'-三リン酸 (24)

- 化合物 21(89 mg, 0.26 mmol)をピリジン共沸し、ピリジン(260 μ L)に溶解した。アルゴン雰囲気下、ジオキサン(780 μ L)を加え、室温にて攪拌した。サリチルホスホクロリダイト(58 mg, 2.9 mmol)のジオキサン溶液を加えて 10 分攪拌した。0.5M ビスブチルアンモニウムピロリン酸の DMF 溶液(780 μ L)を加え、ブチルアミン(260 μ L)を素早く加え 10 分攪拌した。ピリジン/水 (98/2, v/v) 中 1 %ヨウ素(5 mL)を加え、5 分攪拌した。5%亜硫酸水素ナトリウム水溶液を数滴加え 40 分攪拌した。反応液にアンモニア水を(8 mL)加え 3.5 時間攪拌し、減圧下溶媒留去した。残渣を水 300 mL に溶解し、イオン交換クロマトグラフィー($H_2O \rightarrow 1N$ TEAB)にて精製したのち、塩交換カラム(H^+ 型)にて精製し、減圧下溶媒留去した。残渣を水 5 mL に溶解し、塩交換カラム(Na^+ 型)にて精製し、減圧下溶媒留去した。化合物 24(80 mg, 55%)を薄黄色油状物質として得た。
- FAB-HRMS 計算値 $C_9H_{12}N_2Na_3O_{14}P_3S$ (M^+)563.8893. 実測値 563.8892
- ^{31}P -NMR(108 MHz, D_2O) δ : -5.68 (d, $J = 20$ Hz), -10.56 (d, $J = 20$ Hz), -21.27 (t, $J = 20$ Hz).

実施例 10 4'-チオ CTP (28) の合成 (図 2)

- N^4 -ベンゾイル-1-[5-O-(4-メトキシトリチル)-2,3-O-ジアセチル-4-チオ- β -D-リボフラノシル]シトシン(26)

- アルゴン雰囲気下、化合物 25(302 mg, 0.83 mmol)のピリジン(10 mL)溶液に塩化 4-メトキシトリチル(383 mg, 1.2 mmol)を加え、室温にて 9 時間攪拌した。アルゴン雰囲気下、無水酢酸(313 μ L, 3.32 mmol)を加え室温にて 3 時間攪拌した。メタノールを加えて 5 分攪拌し、反応液を減圧下溶媒留去した。残渣を酢酸エチルに溶解し、水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液($\times 3$), 飽和食塩水($\times 1$)で洗浄し Na_2SO_4 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 2: 1 \rightarrow AcOEt)で精製し、化合物 26 (579 mg, 97%)を白色の泡状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 720 (MH^+)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.86 (br s, 1H, NH), 8.32 (d, 1H, H-6, $J_{6,5}=7.6$), 7.89-7.88 (m, 2H, o-Bz), 7.61-7.27 (m, 15H, MMTr, m-Bz, p-Bz, H-5), 6.90-6.87 (m, 2H, MMTr), 6.53 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}=6.2$), 5.70-5.68 (m, 1H, H-3'), 5.17 (m, 1H, H-2'), 3.82 (s, 3H, MeO); 3.63-3.56 (m, 2H, H-5'a, H-4'), 3.46-3.44 (m, 1H, H-5'b), 2.08 (s, 3H, AcO), 2.06 (s, 3H, AcO).

N^4 -ベンゾイル-1-(2,3-O-ジアセチル-4-チオ- β -D-リボフラノシル)シトシン(27)

化合物 26(420 mg, 0.58 mmol)を 80%酢酸水溶液に溶解し、室温にて 24 時間 10 攪拌した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液に滴下し、クロロホルムで分液した。水層をクロロホルムで 3 回抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液($\times 1$),飽和食塩水($\times 1$)で洗浄し Na_2SO_4 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 1 : 1 \rightarrow AcOEt \rightarrow アセトン : AcOEt = 1 : 3)で精製し、化合物 27(239 mg, 92%)を白色泡状物質として得た。 15

FAB-LRMS m/z 448 (MH^+)

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 9.11 (br s, 1H, NH), 8.75 (d, 1H, H-6, $J_{6,5}=7.6$), 7.86-7.84 (m, 2H, o-Bz), 7.60-7.43 (m, 4H, H-5, m-Bz, p-Bz), 6.45 (d, 1H, H-1', $J_{1',2'}=6.7$), 5.83-5.80 (m, 1H, H-3'), 5.58-5.68 (m, 1H, H-2'), 4.45 (br s, 1H, OH), 20 4.07-4.04 (m, 1H, H-5'a), 3.90-3.86 (m, 1H, H-5'b), 3.61-3.60 (m, 1H, H-4'), 2.11 (s, 3H, AcO), 2.01 (s, 3H, AcO)

4'-チオシチジン 5'-三リン酸(28)

化合物 24 の合成と同様、化合物 27(71mg, 0.16 mmol)をサリチルホスホクロロリダイト(50 mg, 0.24 mmol)と処理することにより、化合物 28(68 mg, 75%)を白色の粉状物質として得た。 25

FAB-HRMS 計算値 $C_9H_{12}N_3Na_3O_{13}P_3S$ ($M-H$) $^+$ 563.8893. 実測値 563.8892.

^{31}P -NMR(108 MHz, D_2O) δ : -6.28 (d, $J = 20$ Hz), -10.49 (d, $J = 20$ Hz), -21.24 (t, $J = 20$ Hz).

実施例 11 4'-チオ ATP (32) の合成 (図 3)

N⁶-ベンゾイル-9-[5-O-(4-メトキシトリチル)-2,3-O-ジアセチル-4-チオ-β-D-リボフラノシル]アデニン(30)

- 5 アルゴン雰囲気下、化合物 29(77 mg, 0.2 mmol)のピリジン(2mL)溶液に塩化 4-メトキシトリチル(92 mg, 0.3 mmol)を加え、室温にて攪拌した。12 時間後、さらに塩化 4-メトキシトリチル(92 mg, 0.3 mmol)を加え、室温にて攪拌した。24 時間後、反応液に無水酢酸(94 μL, 1.0 mmol)を加え室温にて 12 時間攪拌した。反応液に氷水を加えて 5 分攪拌した後、減圧下溶媒留去した。残渣を酢酸
- 10 エチルに溶解し、水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(×3)、飽和食塩水(×1)で洗浄し Na₂SO₄ 乾燥した。綿栓濾過後、減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 1 : 2 → AcOEt)で精製し、化合物 30(100 mg, 68%)を無色のガラス状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 730 (MH⁺).

- 15 ¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ : 8.99 (br s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.02 (m, 2H), 7.64-7.28 (m, 15H), 6.86 (m, 2H), 6.31 (d, 1H, J = 7.3), 6.02 (m, 1H), 5.72 (m, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.68 (m, 1H), 3.55 (m, 2H), 2.14 and 1.98 (each s, each 3H).

- 20 N⁶-ベンゾイル-9-(2,3-O-ジアセチル-4-チオ-β-D-リボフラノシル)アデニン(31)

アルゴン雰囲気下、化合物 30(104 mg, 0.14 mmol)の塩化メチレン(2mL)溶液に 0℃下、トリフルオロ酢酸(20 μL)を加えた後、室温に昇温し 5 時間攪拌した。反応液にトリエチルアミン(140 μL)を加え減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカ

- 25 ゲルクロマトグラフィー(AcOEt : アセトン = 0 : 1 → 1 : 2)で精製し、化合物 31 (53 mg, 79%)を白色泡状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 472 (MH⁺).

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ : 8.98 (br s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.00 (m, 2H), 7.59-7.48 (m, 3H), 6.28 (m, 1H), 6.14 (d, 1H, J = 7.3), 5.69 (m, 1H), 4.75 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 2.16 and 1.95 (each s, each 3H).

4'-チオアデノシン 5'-三リン酸(32)

化合物 24 の合成と同様, 化合物 31 (53mg, 0.11 mmol)をサリチルホスホロクロリダイト(25 mg, 0.12 mmol)と処理することにより化合物 32 (45 mg, 68%)を白色の粉状物質として得た。

FAB-HRMS 計算値 $C_{10}H_{13}N_5Na_3O_{12}P_3S$ (MH^+) 589.9265. 実測値 589.9268.

^{31}P -NMR(108 MHz, D_2O) δ : -5.30 (d, $J = 20$ Hz), -10.39 (d, $J = 20$ Hz), -20.88 (t, $J = 20$ Hz).

10 実施例 1 2 4'-チオ GTP (37) の合成 (図 4)

 N^2 -(N,N' -ジブチルアミノメチレン)-9-(4'-チオ- β -D-リボフラノシル)グアニン(34)

アルゴン雰囲気下, 化合物 33(106 mg, 0.46 mmol)の DMF(3 mL)溶液に N,N' -ジブチルホルムアミドジメチルアセタール(302 μ L, 0.92 mmol)を加え, 室温にて 3.5 時間攪拌した。反応液を減圧下溶媒留去した後, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(20%MeOH in $CHCl_3$)で精製し, 化合物 34(139 mg, 69%)を白色の固体として得た。

FAB- HRMS 計算値 $C_{19}H_{30}N_6O_4S$ (MH^+) 439.2153. 実測値 439.2156.

1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 8.54 (s, 1H, $N=CH$), 8.08 (s, 1H, H-8), 5.74(d, 1H, H-1', $J_{1',2'}=6.6$), 5.48(d, 1H, 2'-OH, $J_{2'-OH,2'}=6.0$), 5.31(d, 1H, 3'-OH, $J_{3'-OH,3'}=4.5$), 5.14(m, 1H, 5'-OH), 4.60-4.55 (m, 1H, H-2'), 4.19-4.17 (m, 1H, H-3'), 3.80-3.55 (m, 2H, H-5'a, b), 3.48-3.48 (m, 5H, H-4', n-Bu), 1.56-0.82(m, 14H, n-Bu).

 N^2 -(N,N' -ジブチルアミノメチレン)-9-[5-O-(4-メトキシトリチル)-2,3-O-ジアセチル-4'-チオ- β -D-リボフラノシル]グアニン(35)

25 アルゴン雰囲気下, 化合物 34(135 mg, 0.31 mmol)のピリジン(4mL)溶液に塩化 4-メトキシトリチル(143 mg, 0.47 mmol)を加え, 室温にて攪拌した。23 時間後, さらに塩化 4-メトキシトリチル(47 mg, 0.16 mmol)を加え, 室温にて攪拌した。71 時間後, 反応液に無水酢酸(117 μ L, 1.24 mmol)を加え室温にて 3 時間攪拌した。反応液にメタノールを加えて 5 分攪拌した後, 減圧下溶媒留去した。

残渣を酢酸エチルに溶解し、水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(×3)、飽和食塩水(×1)で洗浄し Na₂SO₄ 乾燥した。綿栓濾過後、減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 1 : 2 → AcOEt)で精製し、化合物 35(158 mg, 64%)を白色の泡状物質として得た。

5 FAB-HRMS 計算値 C₄₃H₅₀N₆O₇S (MH⁺) 795.3528. 実測値 795.3519.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 8.64 (s, 1H, N=CH), 8.44(br s, 1H, NH), 8.00(s, 1H, H-8), 7.47-7.44 (m, 2H, o-Bz), 7.35-7.21 (m, 14H, MMTr, m-Bz, p-Bz), 6.86-6.83 (m, 2H, MMTr), 6.08-6.05 (m, 1H, H-3'), 5.87(d, 1H, H-1', J_{1',2'} = 4.3), 5.56-5.12 (m, 1H, H-2'), 3.80 (s, 3H, MeO), 3.77-3.70 (m, 1H, H-5'a), 3.48-3.29 (m, 6H, H-4', n-Bu, H-5'b), 2.08 (s, 3H, AcO), 2.01 (s, 3H, AcO), 1.65-0.94(m, 14H, n-Bu).

N²-(N,N'-ジブチルアミノメチレン)-9-(2,3-O-ジアセチル-4-チオ-β-D-リボフラノシル)グアニン(36)

アルゴン雰囲気下、化合物 35 (150 mg, 0.19 mmol)の塩化メチレン(3mL)溶液に 0℃下、トリフルオロ酢酸(30 μL)を加えた後、室温に昇温し 5 時間攪拌した。次いで、反応液にトリエチルアミン(120 μL)を加え減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(AcOEt : アセトン = 3 : 1 → 1 : 1)で精製し、化合物 36 (93 mg, 92%)を白色泡状物質として得た。

FAB-HRMS 計算値 C₂₃H₃₄N₆O₆S (MH⁺) 523.2339. 実測値 523.2346.

20 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 8.60 (s, 1H, N=CH), 8.07 (s, 1H, H-8), 6.13-6.11 (m, 1H, H-2'), 6.06 (d, 1H, H-1', J_{1',2'} = 6.2), 5.69-5.67 (m, 1H, H-3'), 5.43-5.41 (m, 1H, 5'-OH), 3.84-3.79 (m, 1H, H-5'a), 3.74-3.66 (m, 1H, H-5'b), 3.59-3.54 (m, 1H, H-4'), 3.48-3.34 (m, 4H, n-Bu), 2.08 (s, 3H, AcO), 1.97 (s, 3H, AcO), 1.61-0.89 (m, 14H, n-Bu).

25

4'-チオグアノシン 5'-三リン酸(37)

化合物 24 の合成と同様、化合物 36 (52mg, 0.1 mmol)をサリチルホスホクロロリダイト(20 mg, 0.15 mmol)と処理することにより化合物 37(25 mg, 41%)を白色の粉状物質として得た。

FAB-HRMS 計算値 $C_{10}H_{14}N_5Na_3O_{13}P_3S$ (MH^+) 605.9215. 実測値 605.9214.

^{31}P -NMR(108 MHz, D_2O) δ : -5.15 (d, $J = 20$ Hz), -10.41 (d, $J = 20$ Hz), -20.79 (t, $J = 20$ Hz).

5 実施例 13 4'-チオ-2'-デオキシ UTP (45) の合成 (図 5)

1-[2-プロモ-2-デオキシ-3,5-O-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-4-チオ- β -D-リボフラノシル]ウラシル(40)

化合物 39 (757 mg, 1.5 mmol)のジクロロメタン(15 mL)溶液にジメチルアミノピリジン(733 mg, 6.0 mmol), トリフルオロメタンスルホン酸無水物(0.5 mL, 3.0 mmol)を加え, 室温で10分撹拌した。反応液に酢酸エチルを加え, 水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液($\times 3$), 飽和食塩水($\times 1$)で洗浄し Na_2SO_4 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をトルエンで共沸した後, 1,4-ジオキサン (15 mL)に溶解した。その溶液に臭化リチウム (195 mg, 2.25 mmol)と三フッ化ホウ素—ジエチルエーテルコンプレックス(285 μ L, 2.25 mmol)を加え, 50 $^{\circ}C$ で1.5時間加熱した。反応液に酢酸エチルを加え, 水で分液した。有機層を飽和食塩水($\times 1$)で洗浄し Na_2SO_4 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 2:1 \rightarrow 1:1)で精製し, 化合物 40 (561 mg, 66%)を白色の泡状物質として得た。

20 FAB-LRMS m/z 566, 568 (MH^+)

1H NMR (270 MHz, $CDCl_3$) δ : 8.65 (br s, 1H), 8.41 (d, 1H, $J = 8.6$), 5.99 (s, 1H), 5.68 (dd, 1H, $J = 2.0$ and 8.6), 4.31 (m, 1H), 4.14–3.98 (m, 3H), 3.67 (m, 1H), 1.57–0.92 (m, 28H).

25 1-[2-デオキシ-3,5-O-(1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-4-チオ- β -D-リボフラノシル]ウラシル(41)

化合物 40 (519 mg, 0.92 mmol)のジクロロメタン(15 mL)溶液に水素化トリブチルスズ(371 μ L, 1.38 mmol)続いて V-70 (57 mg, 0.18 mmol)を加え室温で10分間撹拌した。溶媒を留去し, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサ

ン : AcOEt = 10:1→2:1)で精製し、化合物 41 (440 mg, 98%)を白色の泡状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 487 (MH⁺)

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ : 8.62 (br s, 1H), 8.28 (d, 1H, J = 8.6), 5.97 (d, 1H, J = 6.6), 5.68 (dd, 1H, J = 2.0 and 8.6), 4.37 (m, 1H), 4.11 (dd, 1H, J = 3.3 and 12.5), 3.30 (m, 1H), 2.45 (m, 1H), 2.24 (m, 1H), 1.61–0.94 (m, 28H).

1-(2-デオキシ-4-チオ-β-D-リボフラノシル)ウラシル(42)

化合物 41 (437 mg, 0.9 mmol)のメタノール(20 mL)溶液にフッ化アンモニウム (666 mg, 18 mmol)を加え、70 °Cで加熱還流した。1時間後溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(MeOH in CHCl₃ = 5%→25%)で精製し、化合物 42 (193 mg, 88%)を白色固体として得た。

FAB-LRMS m/z 245 (MH⁺)

¹H NMR (270 MHz, DMSO-d₆ + D₂O) δ : 7.95 (d, 1H, J = 7.9), 6.22 (dd, 1H, J = 7.4 and 8.0), 5.65 (d, 1H, J = 7.9), 4.31 (m, 1H), 3.54 (m, 1H), 3.26 (m, 1H), 2.13 (m, 2H).

1-[2-デオキシ-5-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-3-O-アセチル-4-チオ-β-D-リボフラノシル]ウラシル(43)

アルゴン雰囲気下、化合物 42(122 mg, 0.5 mmol)のピリジン(3 mL)溶液に塩化 4,4'-ジメトキシトリチル(203 mg, 1.5 mmol)を加え、室温にて 12 時間攪拌した。アルゴン雰囲気下、無水酢酸(141 μL, 3.32 mmol)を加え室温にて 1 時間攪拌した。メタノールを加えて 5 分攪拌し、反応液を減圧下溶媒留去した。残渣を酢酸エチルに溶解し、水で分液した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(×3), 飽和食塩水(×1)で洗浄し Na₂SO₄ 乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 2:1→1:2)で精製し、化合物 43(233 mg, 79%)を白色の泡状物質として得た。

FAB-LRMS m/z 589 (MH⁺)

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ : 8.24 (br s, 1H), 7.65 (d, 1H, J = 8.0), 7.42–7.25 (m,

9H), 6.83 (m, 4H), 6.44 (m, 1H), 5.41 (m, 2H), 3.78 (s, 6H), 3.59 (m, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.29 (m, 1H), 2.46 (m, 1H), 2.11 (m, 1H), 2.09 (s, 3H).

1-[2-デオキシ-3-O-アセチル-4-チオ-β-D-リボフラノシル]ウラシル(44)

- 5 化合物 43(420 mg, 058 mmol)のジクロロメタン溶液 (2 mL) にトリフルオロ酢酸 (200 μL) を加え、室温で攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(×2),飽和食塩水(×1)で洗浄し Na₂SO₄乾燥した。綿栓濾過後に減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : AcOEt = 1:2→AcOEt)で精製し、化合物 44 (30 mg, 32%)を白色泡状物質として得た。
- 10

FAB-LRMS m/z 287 (MH⁺)

¹H NMR (270 MHz, CDCl₃) δ: 9.25 (br s, 1H), 8.07 (d, 1H, J = 8.0), 6.43 (m, 1H), 5.79 (d, 1H, J = 8.0), 5.41 (m, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.77 (m, 1H), 3.57 (m, 1H), 2.75 (br s, 1H), 2.50 (m, 1H), 2.35 (m, 1H), 2.09 (s, 3H).

15

4'-チオ-2'-デオキシウリジン 5'-三リン酸(45)

化合物 24 の合成と同様、化合物 44 (28 mg, 0.1 mmol)をサリチルホスホロクロリダイト(30 mg, 0.15 mmol)と処理することにより化合物 45 (40 mg, 72%)を白色の粉状物質として得た。

- 20 FAB-HRMS 計算値 C₉H₁₃N₂Na₃O₁₃P₃S (MH⁺) 550.9044. 実測値 550.9023.

³¹P-NMR(108 MHz, D₂O) δ: -6.51 (d, J = 20 Hz), -10.42 (d, J = 20 Hz), -21.08 (t, J = 20 Hz).

実施例 1 4 4'-チオ-2'-デオキシ CTP (47), -ATP (49), および -GTP (51) の合成 (図 6)

25

4'-チオ-2'-デオキシシチジン 5'-三リン酸(47)

化合物 24 の合成と同様、化合物 46 (39 mg, 0.1 mmol)をサリチルホスホロクロリダイト(30 mg, 0.15 mmol)と処理することにより化合物 47 (36 mg, 65%)を白色の粉状物質として得た。

FAB-HRMS 計算値 $C_9H_{14}N_3Na_3O_{12}P_3S$ (MH^+) 549.9204. 実測値 549.9219.

^{31}P -NMR(108 MHz, D_2O) δ : -6.18 (d, $J = 20$ Hz), -10.37 (d, $J = 20$ Hz), -21.21 (t, $J = 20$ Hz).

5 4'-チオ-2'-デオキシアデノシン 5'-三リン酸(49)

化合物 24 の合成と同様, 化合物 48 (41 mg, 0.1 mmol)をサリチルホスホロクロリダイト(30 mg, 0.15 mmol)と処理することにより化合物 49 (35 mg, 61%)を白色の粉状物質として得た。

FAB-HRMS 計算値 $C_{10}H_{14}N_5Na_3O_{11}P_3S$ (MH^+) 573.9316. 実測値 549.9237.

10 ^{31}P -NMR(108 MHz, D_2O) δ : -5.54 (d, $J = 20$ Hz), -10.54 (d, $J = 20$ Hz), -20.64 (t, $J = 20$ Hz).

4'-チオ-2'-デオキシグアノシン 5'-三リン酸(51)

15 化合物 24 の合成と同様, 化合物 50 (46 mg, 0.1 mmol)をサリチルホスホロクロリダイト(30 mg, 0.15 mmol)と処理することにより化合物 51 (32 mg, 55%)を白色の粉状物質として得た。

FAB-HRMS 計算値 $C_{10}H_{14}N_5Na_3O_{12}P_3S$ (MH^+) 589.9265. 実測値 589.9239.

^{31}P -NMR(108 MHz, D_2O) δ : -5.30 (d, $J = 20$ Hz), -10.68 (d, $J = 20$ Hz), -20.60 (t, $J = 20$ Hz).

20

実施例 15 T7 RNA ポリメラーゼによる 4'-チオ UTP の RNA 鎖への取り込み

25 実施例 9 で得られた 4'-チオ UTP を用いて, T7 RNA ポリメラーゼを用いた取り込み実験を行った。実験には, T7 プロモーター配列を含む二本鎖 DNA を用いた (図 7)。ATP, GTP, CTP, UTP すべてのヌクレオチドが存在する場合, 図に示される相補的な 26 mer の RNA が合成されるはずである。

反応は, 40 mM Tris-HCl, PH8.0, 8 mM $MgCl_2$ 2 mM スペルミジン, 5 mM DTT, 0.4 mM NTP, 17nM [γ - ^{32}P]GTP, 2.0 μ M テンプレート DNA および 100U の T7 RNA ポリメラーゼを含む 20 μ L 中で行った。NTP はそれぞれ, (1) GTP, (2) GTP + ATP, (3) GTP + ATP + CTP, (4) GTP + ATP

+ CTP + UTP, および (5) GTP + ATP + CTP + 4'-チオ UTP であった。上記の反応溶液を 37℃で 3 時間インキュベーションし、反応を停止した。つづいて、20%変性ポリアクリルアミドゲル(30×40×0.05 cm, 1800 V, 1 時間, 1×TEB)にて電気泳動を行い、オートラジオグラフィーにて解析した。

- 5 結果を図 8 に示す。レーン 1 では、G の 2mer と 3mer に対応するバンド、およびラダーが見られた。レーン 2 では予測された 6mer で鎖伸長の停止したバンドが観察され、さらに 1 残基伸長したバンドがわずかに見られた。レーン 3 では予測された 9mer で鎖伸長の停止したバンドが観察され、さらに 1 残基伸長したバンドがわずかに見られた。レーン 4 では全長産物である 26mer のバンドが
- 10 観察された。UTP のかわりに 4'-チオ UTP を用いたレーン 5 では、レーン 4 とほぼ同程度の割合で全長産物のバンドが観察された。すなわち、4'-チオ UTP も天然の UTP と同様に T7 RNA ポリメラーゼにより基質として認識され、RNA 鎖に取り込まれることが示された。

15 実施例 16 T7 RNA ポリメラーゼによる 4'-チオ UTP および 4'-チオ CTP の RNA 鎖への取り込み

- 4'-チオ UTP および 4'-チオ CTP を用いて、T7 RNA ポリメラーゼを用いた取り込み実験を行った。実験には、T7 プロモーター配列を含む 47mer 2 本鎖 DNA を用いた (図 9)。ATP, GTP, CTP, UTP すべてのヌクレオチドが存在する場合、
- 20 図に示される 30mer の RNA が合成されるはずである。

- 反応は、40 mM Tris-HCl, pH8.0, 8mM MgCl₂, 2mM スペルミジン, 5mM DTT, 0.4 mM NTP, 17 nM [γ -³²P]GTP, 2.0 μ M テンプレート DNA および 100U の T7 RNA ポリメラーゼを含む 20 μ L 中で行った。NTP はそれぞれ 1) ATP, GTP, CTP, UTP, 2) UTP の代わりに 4'-チオ UTP を用いた系, 3) CTP の代わりに
- 25 4'-チオ CTP を用いた系, 4) UTP および CTP を 4'-チオ UTP および 4'-チオ CTP に置き換えた系であった。上記の反応溶液を 37 °C で 3 時間インキュベートし、反応を停止した。つづいて、20%変性ポリアクリルアミドゲル (30 X 40 X 0.05 cm, 1800 V, 1 時間, 1 X TEB) にて電気泳動を行い、オートラジオグラフィーにて解析した。

- UTP の代わりに 4'-チオ UTP を用いた系, CTP の代わりに 4'-チオ CTP を用いた系, 両 NTP を修飾 NTP に置換した系のいずれにおいても, 全長産物である 30 mer RNA が観察された。天然 NTP を用いた場合の転写効率を 100 とした場合の相対効率を図 10 に示す。この結果から, 4'-チオ UTP および 4'-チオ CTP も T7 RNA ポリメラーゼにより基質として認識され, RNA 鎖に効率よく取り込まれることが示された。

実施例 17 4'-チオ UTP および 4'-チオ CTP 含有 RNA 鎖からの cDNA の合成

- 実施例 16 において転写反応によって得られた 4'-チオ RNA をテンプレートとし, 逆転写酵素を用いて, cDNA が得られるかについて検討した。本実験を行うためには, より鎖長の長い RNA が必要であり, 図 11 に示す 76mer 2 本鎖 DNA をテンプレートとして用いた。まず GTP, ATP, 4'-チオ UTP および 4'-チオ CTP 存在下, T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応を行った。反応は実施例 16 と同様の条件で行い, 効率良く 4'-チオ RNA へと転写できた。得られた 59mer の 4'-チオ RNA をテンプレートとして逆転写酵素による cDNA への逆転写を行った。

反応は以下の方法で行った。5'末端をラジオラベルしたプライマー 4 μ L (20 pmol), 59mer RNA 6 μ L (20 pmol), を混和後それぞれの溶液に以下の dNTP を加えた。

- 20 レーン 1 : プライマー
 レーン 2 : 酵素なし
 レーン 3 および レーン 7 : dTTP
 レーン 4 および レーン 8 : dTTP, dTCP
 レーン 5 および レーン 9 : dTTP, dCTP, dATP
25 レーン 2 および レーン 6 および レーン 10 : dTTP, dCTP, dATP, dGTP

以上各々の反応溶液を 70°C, 15 分インキュベートし, ただちに 0°C にて 1 分以上インキュベートした。ついで上記の溶液に 0.1M DTT 2 μ L, 5 X ファーストストランドバッファー (250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl₂) 4 μ L, RNase Out 1 μ L, SuperScript™ II RNase⁻リバーシトランスクリプターゼ

(Invitrogen) 1 μ L を加えた。ただし、レーン 2 のみは SuperScriptTM II RNase⁻リ
バーストランスクリプターゼのかわりに滅菌水 1 μ L を加えた。上記の反応溶液
を混和した後 42°C にて 50 分間インキュベート後反応を停止し、12%変性ポリア
クリルアミドゲル(30 X 30 X 0.05 cm, 1300V, 1 時間, 1 X TBE)にて電気泳動を行
い、オートラジオグラフィーにて解析した。結果を図 1 2 に示す。

4'-チオ RNA をテンプレートとした場合でも逆転写反応は進行し、天然 RNA
をテンプレートとした場合と遜色ない効率で cDNA へと逆転写できることが明
かとなった。また得られた cDNA はシーケンシングを行い、これにより配列
に誤りがないことを確認した。

10

実施例 1 8 4'-チオ UTP および 4'-チオ CTP 含有 RNA 鎖の RNase A 耐性

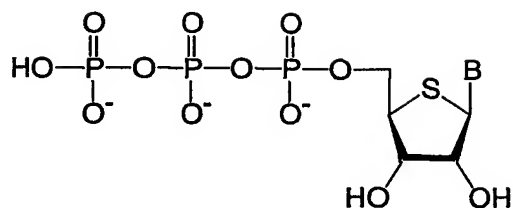
実施例 1 6 で得られた 59 mer の 4'-チオ RNA の酵素耐性の実験を RNase A
を用いて行った。

反応は 10mM Tris-HCl(PH7.4), 5mM EDTA(PH7.5), 300mM NaCl, RNase A
0.25mM, 天然型 RNA あるいは 4'-チオ RNA 80pmol を含む 30 μ L 中で行った。
上記の反応溶液を 0°C にてインキュベートした。サンプリングは 30 秒, 1 分, 3
分, 5 分, 10 分, 30 分, 60 分, にて反応溶液 4 μ L を, 10M 尿素, 50mM
EDTA, XC(0.1%), BPB(0.1%), を含むローディング溶液 7 μ L と混和し反応を停
止させた。つづいて, 16%変性ポリアクリルアミドゲル(30 X 30 X 0.05 cm, 600V,
1 時間 30 分, 1 X TBE)にて電気泳動を行い, オートラジオオグラフィーにて解
析した。結果を図 1 3 に示す。

天然型 RNA が 30 秒で 90%以上, 酵素分解を受ける条件下, 4'-チオ RNA は
高い抵抗性を示し, その半減期は 12 分であった。4'-チオ RNA の 1 時間後の完
全鎖長産物の残存量は, 天然型 RNA の 30 秒後の完全鎖長産物の残存量より多
いことから, RNase A に対して 100 倍以上安定であることが明らかとなった。

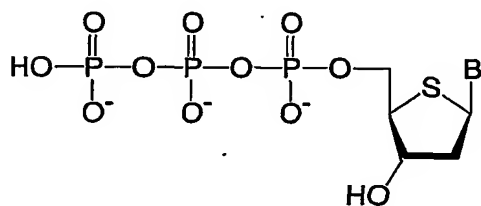
請求の範囲

1. 式 I :



- 5 [式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]
の化合物。

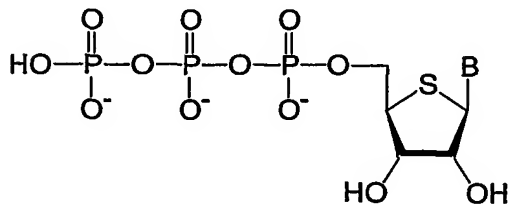
2. 式 II :



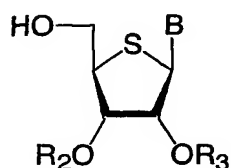
10

- [式中、B' はアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]
の化合物。

15 3. 式 I :

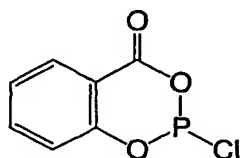


- [式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]
の化合物を合成する方法であって、式 III :



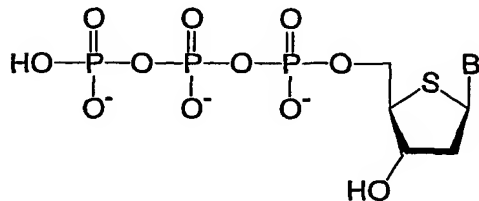
[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基であり、R₂およびR₃はそれぞれ独立してヒドロキシル基の保護基である]

5 の化合物を、式I V：



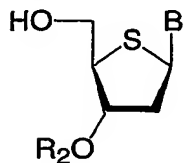
の化合物と反応させ、得られた中間体をピロリン酸と反応させ、次にヨード酸化、加水分解および脱保護することにより式Iの化合物を得ることを含む方法。

10 4. 式I I：



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

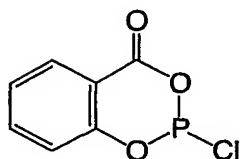
の化合物を合成する方法であって、式V：



15

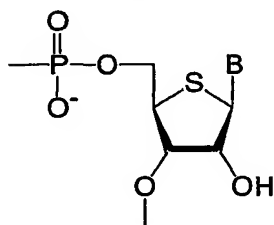
[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基であり、R₂はヒドロキシル基の保護基である]

の化合物を、式I V：



の化合物と反応させ、得られた中間体をピロリン酸と反応させ、次にヨード酸化、加水分解および脱保護することにより式Vの化合物を得ることを含む方法。

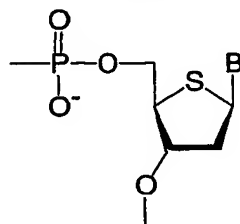
5. 式VI :



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

のヌクレオチド単位を少なくとも1つ含むオリゴヌクレオチドを製造する方法であって、請求項1の化合物または請求項3に記載の方法により製造される化合物の存在下で、RNA合成酵素によりRNA鎖伸長反応を行うことを特徴とする方法。

6. 式VII :



[式中、Bはアデニン、グアニン、シトシン、チミン、ウラシルおよびヒポキサンチンからなる群より選択される核酸塩基である]

のヌクレオチド単位を少なくとも1つ含むオリゴヌクレオチドを製造する方法であって、請求項2の化合物または請求項4に記載の方法により製造される化合物の存在下で、DNA合成酵素によりDNA鎖伸長反応を行うことを特徴とする方法。

1/13

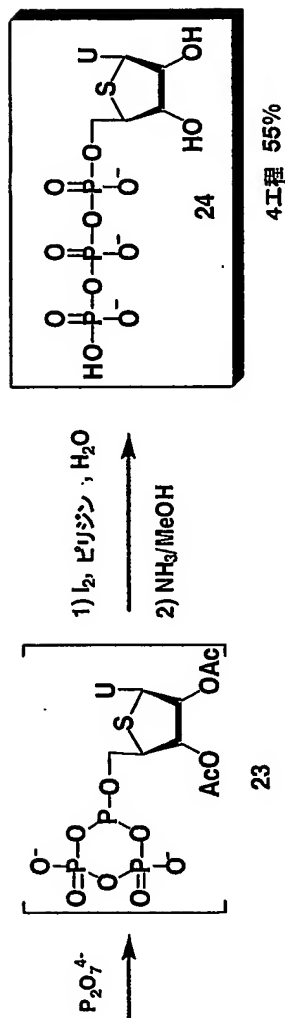
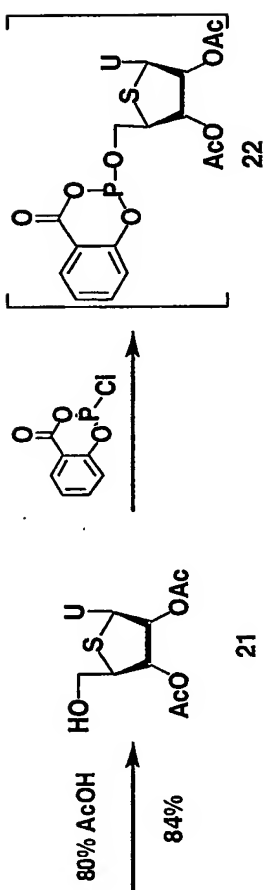
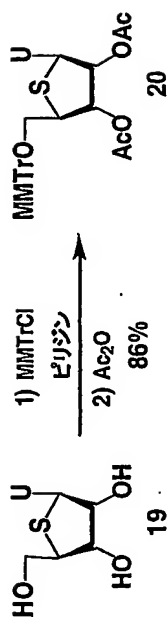


図 1

2/13

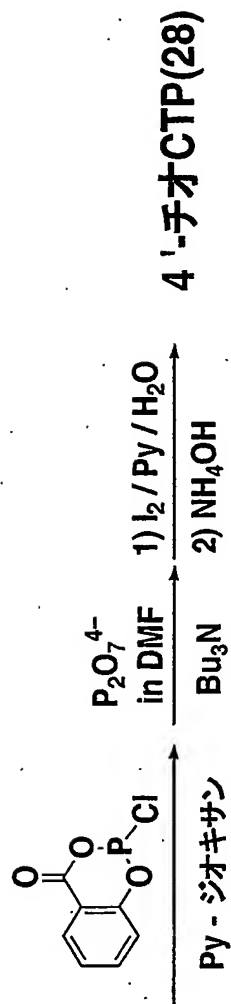
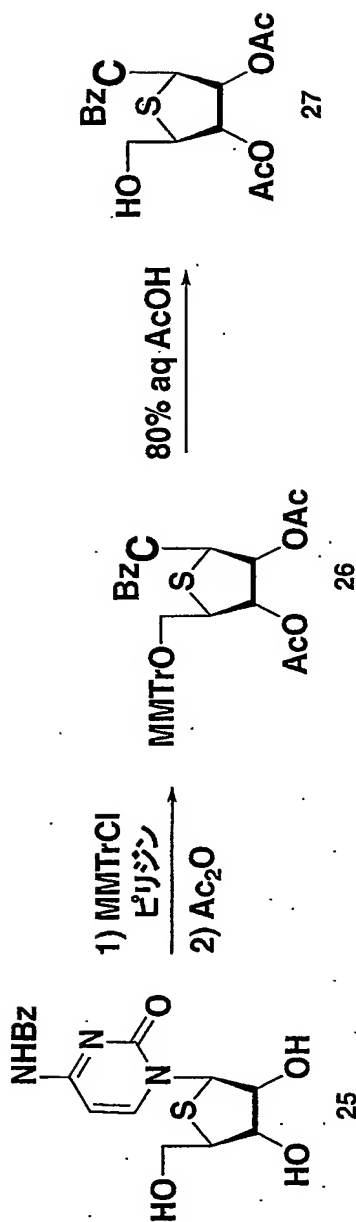


図2

3/13

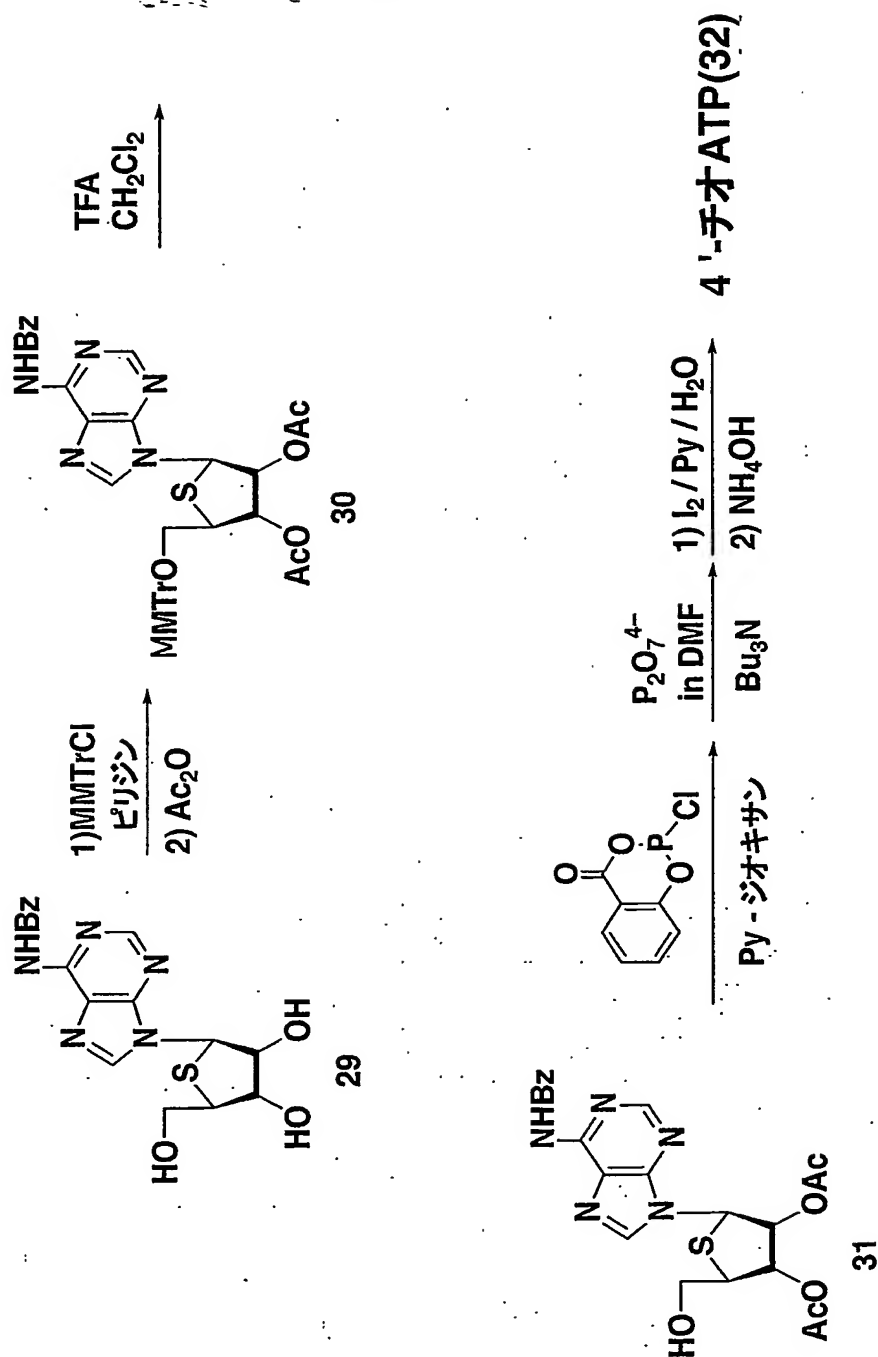
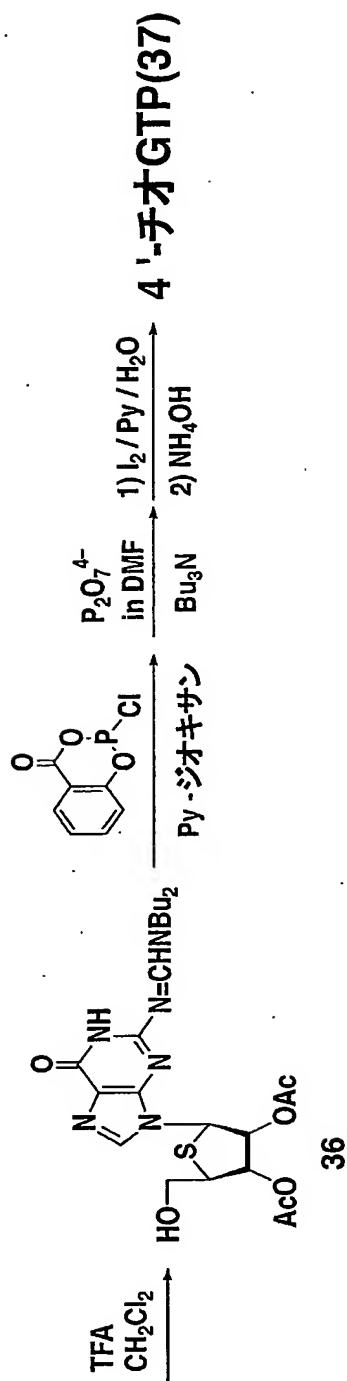
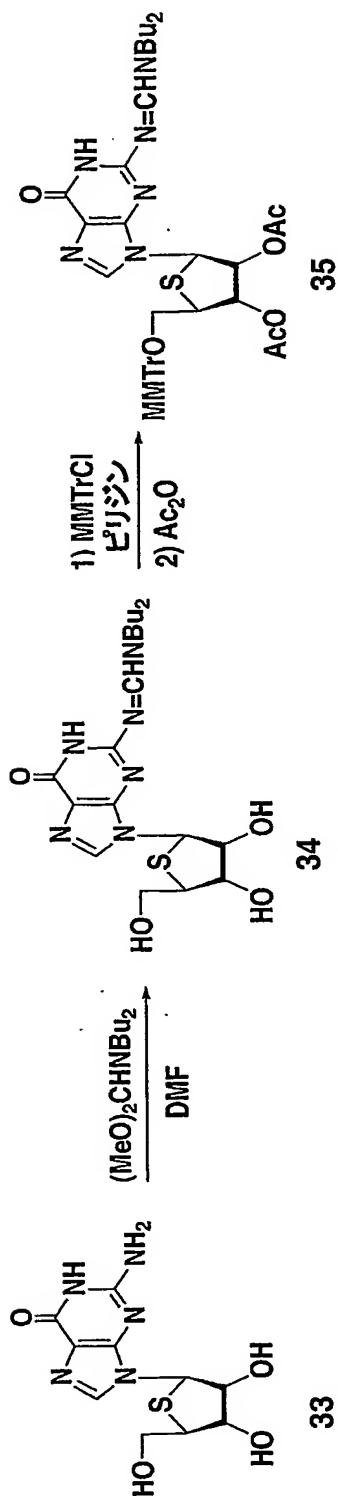
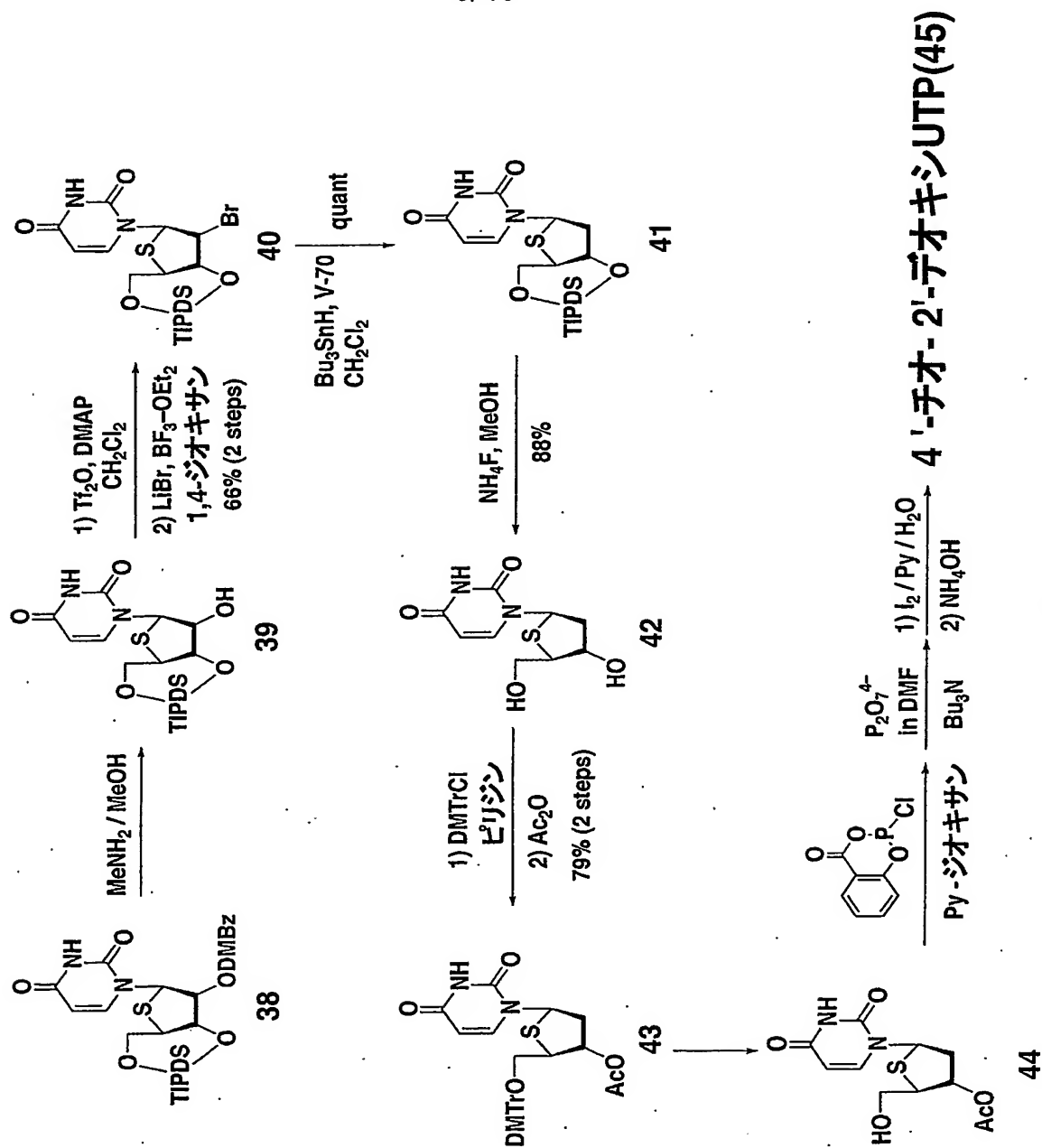


図3

4/13



5/13



6/13

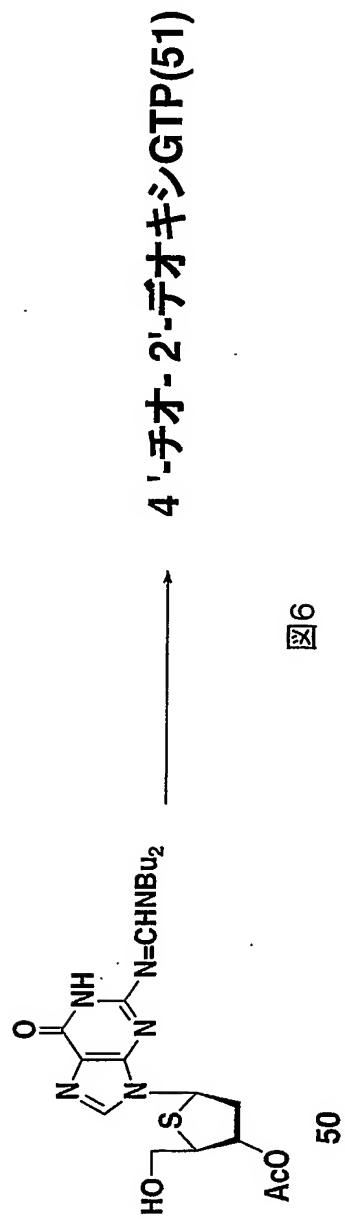
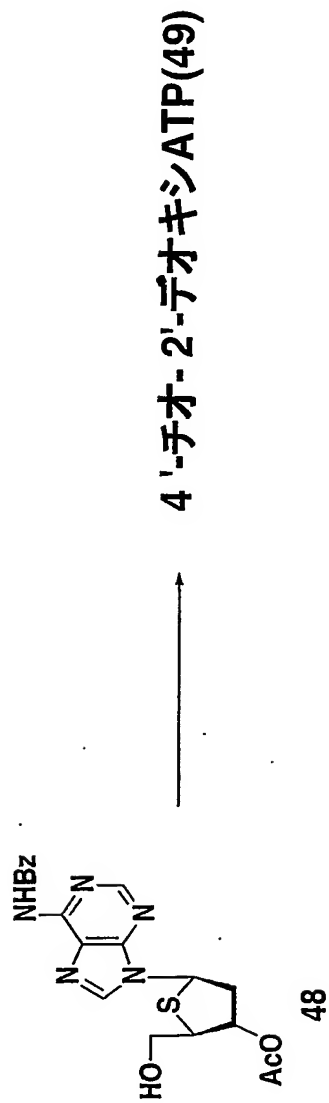
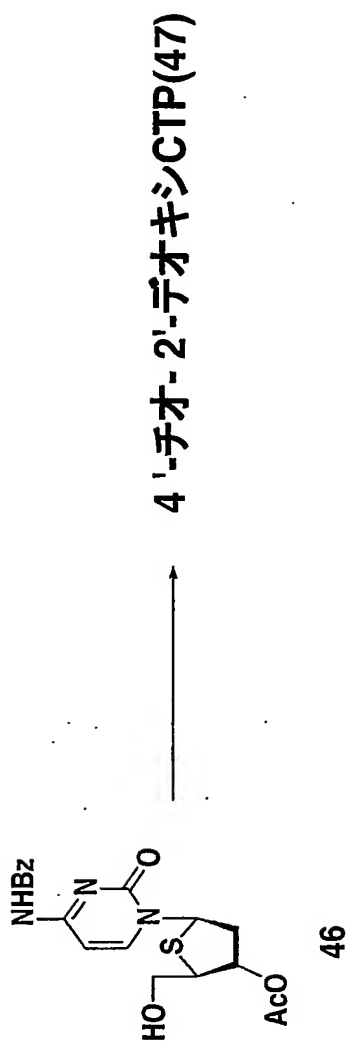
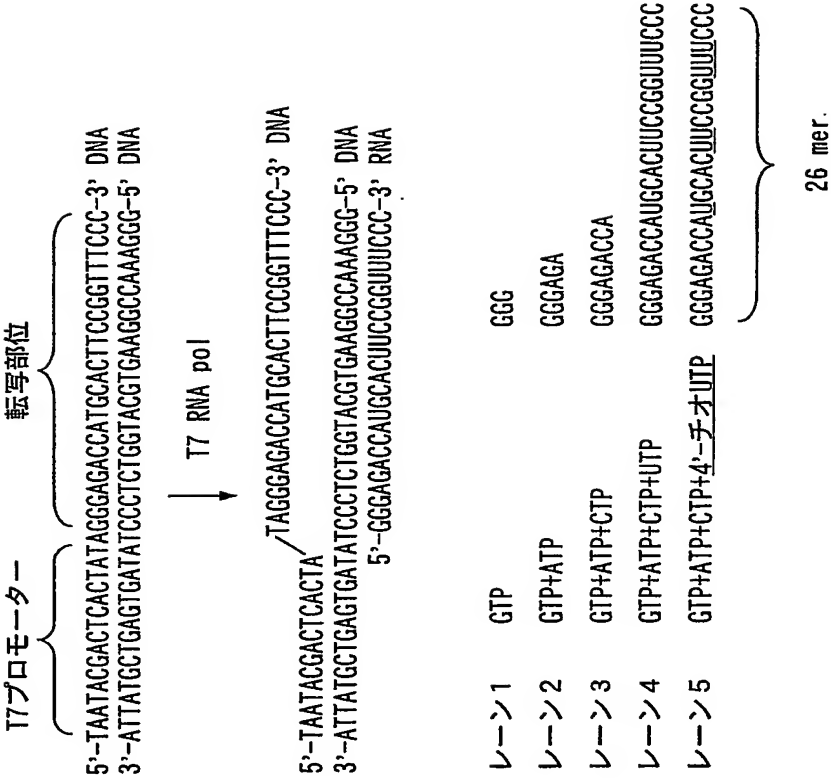
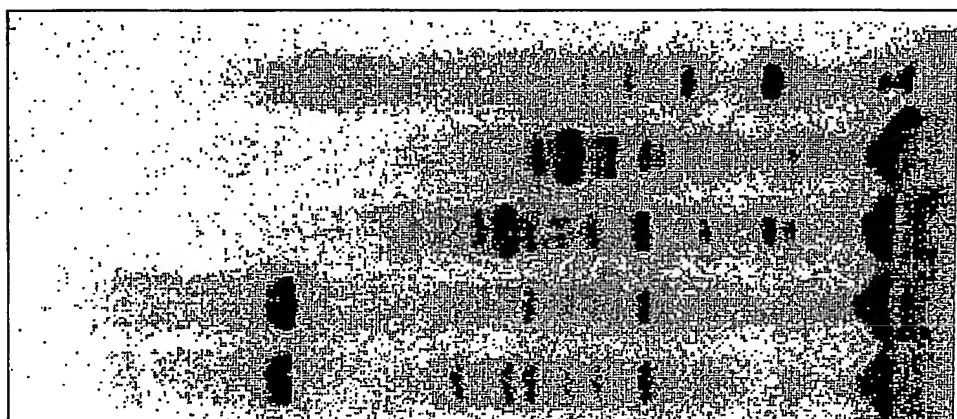


図6



8/13



1
2
3
4
5

図8

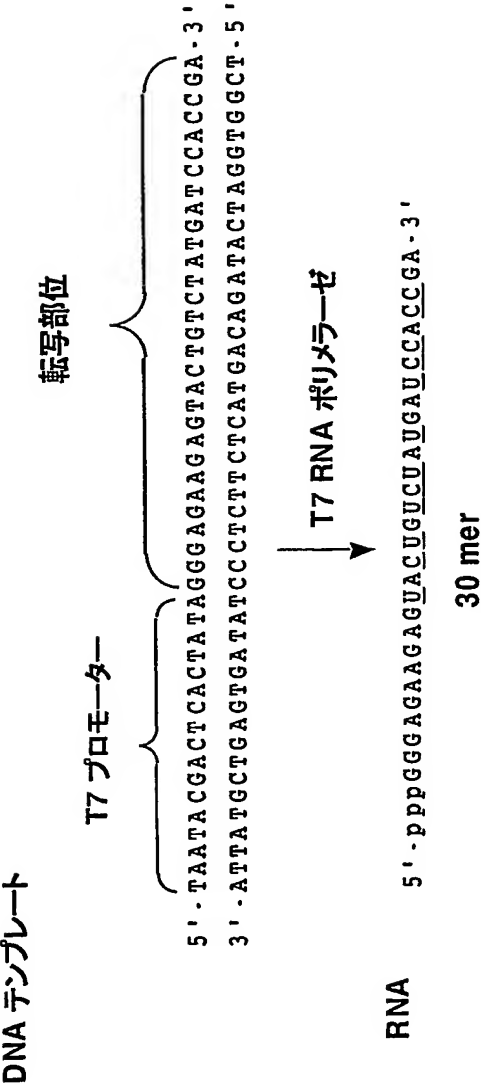


図9

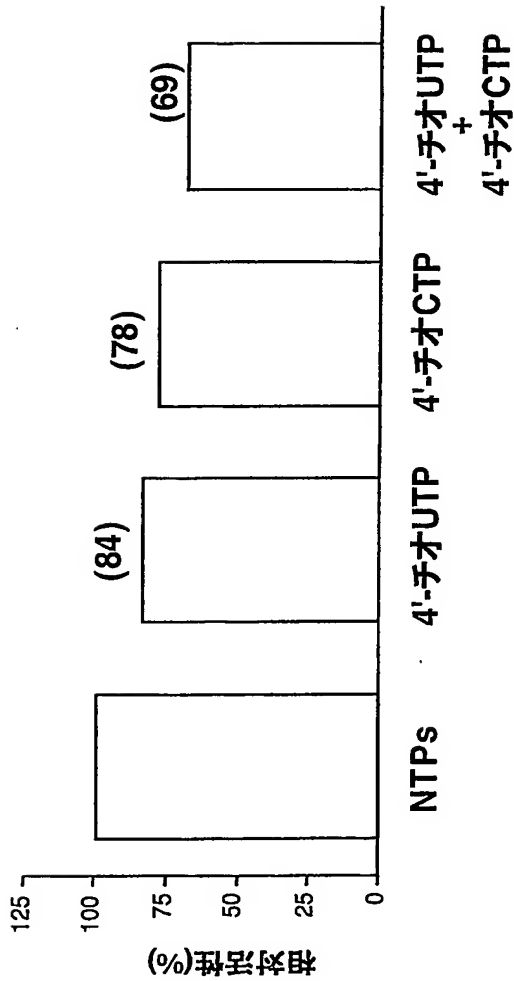


図10

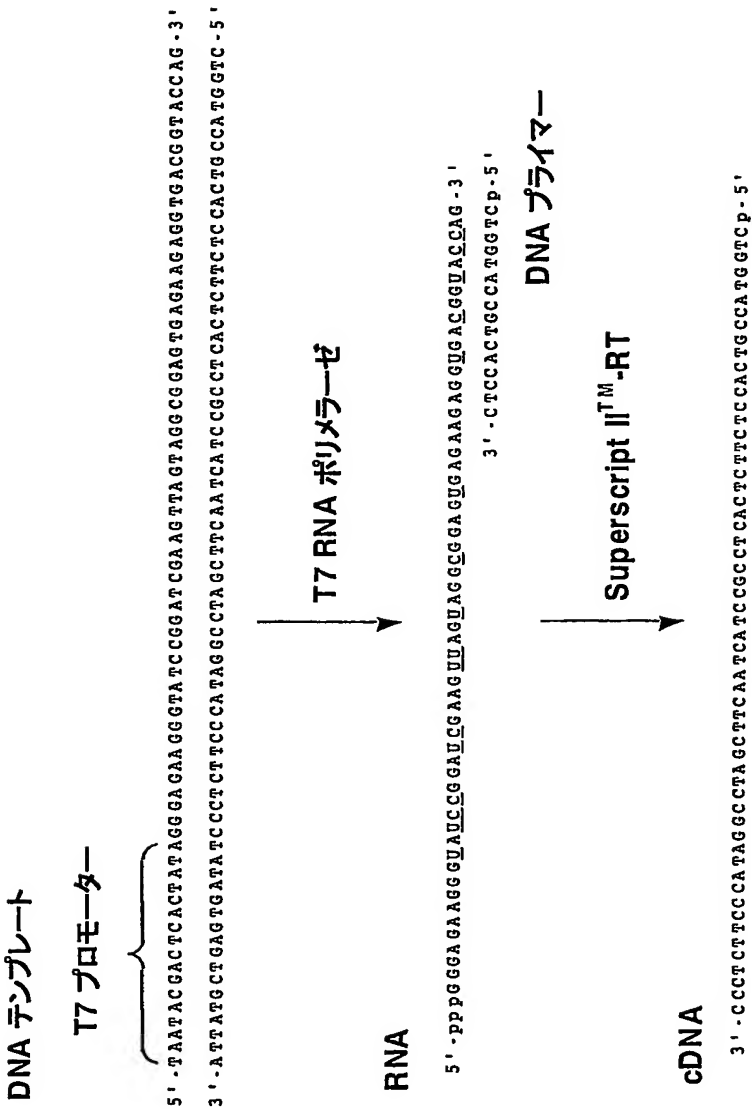
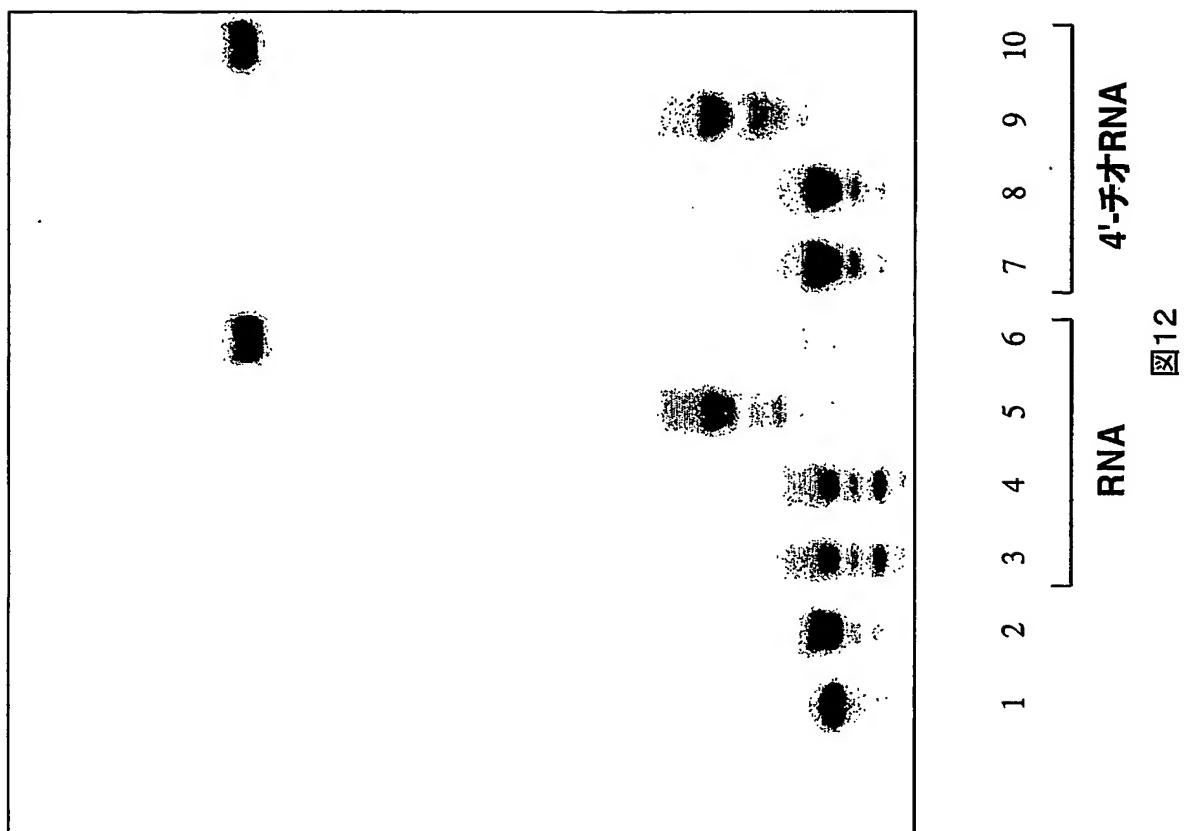


図 11

12/13



13/13

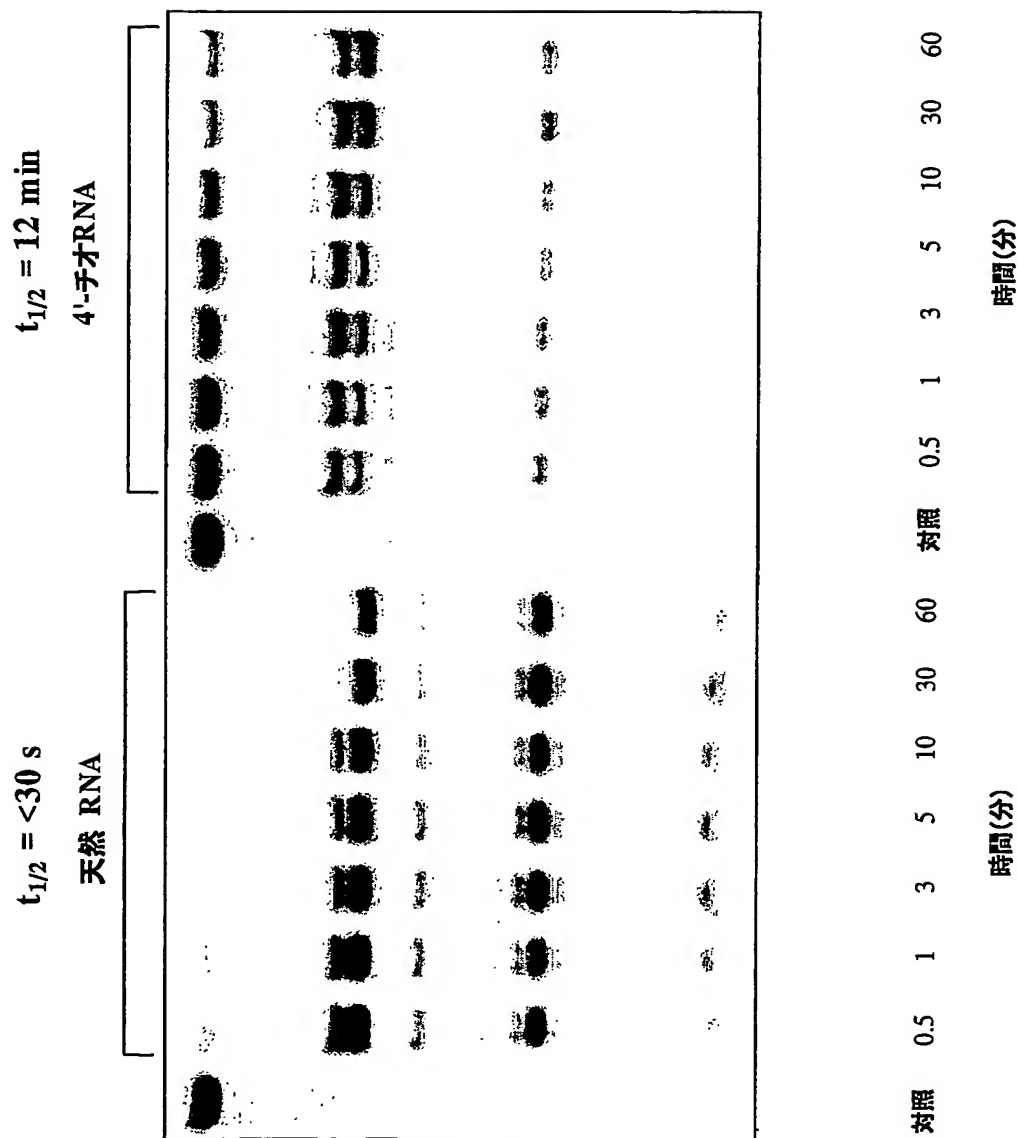


図13

1/3

SEQUENCE LISTING

<110> GeneticLab Co., Ltd.; Akira Matsuda

<120> 4'-thionucleotide

<130> PGL9002W0

<150> JP 2002-242259

<151> 2002-08-22

<160> 11

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> template for RNA synthesis

<400> 1

taatacgact cactataggg agaccatgca cttccggttt ccc

43

<210> 2

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> template for RNA synthesis

<400> 2

gggaaaccgg aagtgcattg tctccctata gtgagtcgta tta

43

<210> 3

<211> 26

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> product of RNA synthesis

<400> 3

gggagaccan gcacuuccgg uuuccc

26

2/3

<210> 4

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> template for RNA synthesis

<400> 4

taatacgact cactataggg agaagagtac tgtctatgat ccaccga

47

<210> 5

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> template for RNA synthesis

<400> 5

tcggtggatc atagacagta ctcttctccc tatagtgagt cgtatta

47

<210> 6

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> product of RNA synthesis

<400> 6

gggagaagag uacugucuau gauccaccga

30

<210> 7

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> template for RNA synthesis

<400> 7

taatacgact cactataggg agaagggtat ccggatcgaa gttagtaggc ggagtgagaa

60

gaggtgacgg taccag

76

3/3

<210> 8

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> template for RNA synthesis

<400> 8

ctggtaccgt cacctcttct cactccgcct actaacttcg atccggatac ctttctccct 60

atagtgagtc gtatta 76

<210> 9

<211> 59

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> product of RNA synthesis

<400> 9

gggagaaggg uauccggauc gaaguuagua ggcggaguga gaagagguga cgguaccag 59

<210> 10

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for reverse transcription

<400> 10

ctggtaccgt cacctc 16

<210> 11

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> product of reverse transcription

<400> 11

ctggtaccgt cacctcttct cactccgcct actaacttcg atccggatac ctttctccc 59

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10576

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07H19/067, 19/073, 19/167, 19/173, A61K31/7068, 31/7072, 31/7076, 31/708, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07H19/067, 19/073, 19/167, 19/173, A61K31/7068, 31/7072, 31/7076, 31/708, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), Medline (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	PARKER, W.B. et al., Metabolism of 4'-Thio-β-D-arabinofuranosylcytosine, Biochemical Pharmacology, 2000, Vol.60, pages 1925 to 1932	1, 2, 5, 6 3, 4
X Y	WO 00/04866 A2 (SOUTHERN RESEARCH INSTITUTE), 03 February, 2000 (03.02.00), Full text & EP 1100512 A2 & JP 2002-521318 A	1, 2, 5, 6 3, 4
X Y	HUANG, Bao-Guo et al., The Chemical Synthesis of 4'-Thio-2'-deoxythymidine-5'-triphosphate and Its Effects on DNA Synthesis, 1993, Vol.38, No.14, pages 1177 to 1180	2, 6 4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
02 October, 2003 (02.10.03)

Date of mailing of the international search report
14 October, 2003 (14.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10576

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALEXANDROVA, L.A. et al., 4'-Thio-5-ethyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (TEDUTP): synthesis and substrate properties in DNA-synthesizing systems, Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 1996, Vol.7, No.5, pages 237 to 242	2, 6
Y	US 2002/0019363 A1 (BIOCHEM PHARMA INC.), 14 February, 2002 (14.02.02), In particular, Par. No. [0182] & WO 01/60315 A2 & EP 1296690 A2 & JP 2003-523978 A	3, 4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07H19/067, 19/073, 19/167, 19/173, A61K31/7068,
31/7072, 31/7076, 31/708, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07H19/067, 19/073, 19/167, 19/173, A61K31/7068,
31/7072, 31/7076, 31/708, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), Medline (STN), BIOSIS (STN),
EMBASE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	PARKER, W. B. et al., Metabolism of 4'-Thio- β -D-arabinofuranosylcytosine, Biochemical Pharmacology, 2000, Vol. 60, pages 1925-1932	1, 2, 5, 6 3, 4
X Y	WO 00/04866 A2 (SOUTHERN RESEARCH INSTITUTE) 2000.02.03、全文 & EP 1100512 A2 & JP 2002-521318 A	1, 2, 5, 6 3, 4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.10.03

国際調査報告の発送日 14.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 幸司

4C 9450

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	HUANG, Bao-Guo, et al., The Chemical Synthesis of 4'-Thio-2'-deoxythymidine-5'-triphosphate and Its Effects on DNA Synthesis, 1993, Vol.38, No.14, pages 1177-1180	2, 6 4
X	ALEXANDROVA, L. A. et al., 4'-Thio-5-ethyl-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate (TEDUTP): synthesis and substrate properties in DNA-synthesizing systems, Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 1996, Vol.7, No.5, pages 237-242	2, 6
Y	US 2002/0019363 A1 (BIOCHEM PHARMA INC.) 2002.02.14、特に[0182] & WO 01/60315 A2 & EP 1296690 A2 & JP 2003-523978 A	3, 4